

**ÜBER DIE WIRKUNG VON
ZYKLISCHEM ADENOSINMONOPHOSPHAT
AUF DIE GLUCONEOGENESE
AUS LACTAT UND PYRUVAT IN DER
HÄMOGLOBINFREI
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER**

Eberhard Loy

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554612_0023

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Professor Dr.Dr. h.c. Th.Bücher

ÜBER DIE WIRKUNG VON ZYKLISCHEM ADENOSINMONOPHOSPHAT
AUF DIE GLUCONEOGENESE AUS LACTAT UND PYRUVAT IN DER
HÄMOGLOBINFREI PERFUNDIERTEN RATTENLEBER



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eberhard Loy

aus

Detmold/Lippe

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. G.Müllhofer

Mitberichterstatter: Prof. Dr.Dr. h.c. Th.Bücher

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1976



1. Einführung	2
2. Methodik	11
2.1. Technik der Leberperfusion	
2.1.1. Tiermaterial	
2.1.2. Perfusionsmedium	
2.1.3. Perfusionsverlauf	
2.2. Chemikalien, Enzyme und Coenzyme, radioaktiv markierte Verbindungen	
2.3. Radioaktivitätsmessungen und Konzentrationsbestimmungen	
2.4. Venöses Perfusat	
2.4.1. Produktions- und Verbrauchsdaten von Metaboliten	
2.4.2. Isolierung von radioaktiven Metaboliten	
2.4.3. Tritium-Austausch in Wasser	
2.5. Tritium- und ^{14}C -Markierung der Glucose im venösen Perfusat	
2.6. Gewebeextrakt	
2.7. Isolierung und Reinigung von Metaboliten des Gewebeextraktes	
2.7.1. Glutamat	
2.7.2. Aspartat, β -Hydroxybutyrat und NAD	
2.7.3. Lactat, Malat und Fumarat	
2.7.4. Pyruvat, Citrat und $\mathcal{L}$ -Glycerophosphat	
2.7.5. Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat	
2.8. Analyse der Tritium- und ^{14}C -Verteilung in den gereinigten Metaboliten	
2.8.1. Malat, Fumarat	
2.8.2. $\mathcal{L}$ -Glycerophosphat	
2.8.3. Citrat	
2.8.4. Lactat	

	Seite ...
3. Ergebnisse	23
3.1. Vorversuche: die Wirkung von DBcAMP auf die Glucosebildung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber	
3.1.1. Stimulierung der Glycogenolyse	
3.1.2. Stimulierung der Gluconeogenese aus L-Lactat, "Normalexperiment"	
3.1.3. Die Wirkung von DBcAMP auf die Gluconeogenese aus Pyruvat	
3.2. Versuche mit 2- ³ H-2- ¹⁴ C-L-Lactat	39
3.2.1. Perfusionsbedingungen, Produktions- und Verbrauchsdaten, Aktivitätsbilanz	
3.2.2. ³ H- und ¹⁴ C-Markierungsmuster einiger Metabolite der Gluconeogenese	
3.2.2.1. Möglichkeiten der ¹⁴ C-Markierung	
3.2.2.2. Markierungsmöglichkeiten tritiiert Positionen	
3.2.2.3. Markierungsverteilung, Kalkulation der zellulären Lactataktivität	
3.2.2.4. ¹⁴ C-Markierung der Glucose	
3.2.2.5. ¹⁴ C-markierte Metabolite der Gluconeogenese	
3.2.2.6. Kalkulation der zellulären Pyruvat- und Acetyl-CoA- ¹⁴ C-Aktivität	
3.2.2.7. Tritiierte Metabolite der Gluconeogenese	
3.2.2.8. Tritiummarkierung der Glucose, "Futile cycle 2"	
4. Diskussion	72
4.1. Zur Signifikanz der Wirkung von DBcAMP	
4.2. Glycerophosphatzyklus und die Wirkung von zyklischem AMP	
4.3. Gluconeogenese und Redoxpotential	
4.4. Die Bedeutung von Wasserstoff- und Substrat-Shuttles für die Gluconeogenese aus Lactat	
4.5. "Futile cycles" in der Gluconeogenese	
4.6. Der Mechanismus der cAMP-Wirkung auf die Gluconeogenese	
Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	92
Verzeichnis der Abkürzungen	100
Lebenslauf	

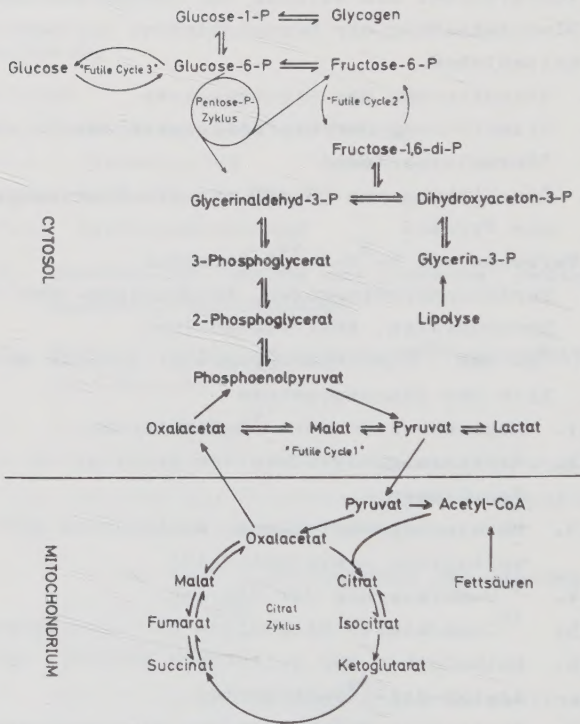


Abb. 1. Stoffwechselweg der Gluconeogenese aus Lactat in der Rattenleber

Die als "Futile cycle 1, 2, 3" gekennzeichneten Stellen markieren thermodynamisch irreversible Reaktionen, die allgemein als Schlüsselstellen der Gluconeogenese betrachtet werden.

- "Futile cycle 1" wird katalysiert durch die Enzyme Pyruvatcarboxylase (PC), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und Pyruvatkinase (PK),
- "Futile cycle 2" durch die Enzyme Fructose-1,6-diPhosphatase (FDPase) und 6-Phosphofructokinase (PFK),
- "Futile cycle 3" durch die Enzyme Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) und Hexokinase (HK).

1. Einführung

Bei höheren Tieren zeigen verschiedene Organe oder Gewebe, wie zentrales Nervensystem, rote Blutkörperchen, Nierenmark und Hoden, zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionen eine weitgehende Abhängigkeit von einer kontinuierlichen Glucosezufuhr. In Situationen eingeschränkter Kohlenhydrataufnahme, z.B. Fasten, wird nach dem Aufbrauchen körpereigener Zuckerreserven (Glycogen) die endogene Glucosebildung aus Nicht-Kohlenhydrat-Quellen wie Aminosäuren und Glycerin, die *G l u c o n e o g e n e s e*, zu einer lebenserhaltenden Aufgabe des Stoffwechsels.

Synthese von Glucose also zur Energieversorgung abhängiger Organe während mangelnder Zufuhr von außen. Eine weitere essentielle Bedeutung der Gluconeogenese leitet sich aus der Möglichkeit ab, Produkte des katabolen Zellstoffwechsels wie z.B. Lactat nach starker Muskeltätigkeit in ein wieder verwertbares Molekül zu überführen ("Cori-Zyklus") und dem Körper als Energieträger zu erhalten (zur Übersicht siehe Ref. 1).

Die Fähigkeit zur Gluconeogenese ist an eine spezifische Enzymausstattung der Zelle gebunden, die lediglich in der Leber und der Nierenrinde vorgefunden wird (2). Im folgenden werde ich mich ausschließlich mit der Leber als gluconeogenetisch aktivem Organ beschäftigen, in Anbetracht der erheblichen Speziesunterschiede beschränke ich mich auf Ergebnisse, die an der Rattenleber gewonnen wurden.

Wie Abb. 1 zeigt, stellt der Stoffwechselweg der Gluconeogenese im wesentlichen eine Umkehr der Glycolyse dar, die allerdings aus energetischen Gründen in 3 Reaktionsfolgen umgangen wird (3). Über gemeinsame Intermediate ergeben sich Beziehungen zum Citrat- und Pentosephosphatzyklus sowie dem Fett- und Aminosäurestoffwechsel. Aus der unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung der beteiligten Reaktionen in cytosolischen und mitochondrialen Kompartimenten ergeben sich Möglichkeiten einer Beeinflussung durch die in den Reaktionsräumen verschiedenen Wasserstoff- und Phosphatpotentiale, sowie eine Abhängigkeit

von der Permeations- bzw. Transportierfähigkeit einzelner Metabolite durch Membranbarrieren (4).

Diese nur angedeutete Komplexität der Gluconeogenese macht das Vorhandensein von übergeordneten Kontrollmechanismen notwendig, die sowohl den Ablauf zellulärer Prozesse koordinieren als auch in die Homöostase des Gesamtorganismus regulierend eingreifen. Diät, Hormone, Neurosekretion und möglicherweise noch andere humorale Faktoren haben solche Kontrollfunktion (5,6). Sie können die Freisetzung von Substraten für die Gluconeogenese in der Peripherie regulieren oder direkt in der Leber die Utilisierung und Umwandlung zur Glucose beeinflussen. Da die Abgabe vieler Stoffe an das Blut reversibel erfolgt, kann eine Stimulierung der Aufnahme durch die Leber über eine Senkung der Plasmaspiegel indirekt eine Freisetzung in der Peripherie fördern. Kontrollfaktoren, die wie das Glucagon primär nur auf die Leber einwirken, können auf diese Weise ihre Funktion auch auf andere Organe erweitern (7).

Die hormonale Regulation der Gluconeogenese wird im wesentlichen vom Glucagon, dem Thyroxin, den Katecholaminen und Glucocorticoiden als Aktivatoren im weitesten Sinne, andererseits vom Insulin als Inhibitor wahrgenommen (4,2,1). Diese Hormone unterscheiden sich durch eine unmittelbare, sofort nach ihrer Applikation einsetzende oder erst nach Stunden erkennbare Wirkung. Dem mögen Regulationsprinzipien ganz unterschiedlicher Natur zugrunde liegen, wie etwa die direkte Wechselwirkung mit Enzymmolekülen oder eine Beeinflussung des Enzym-Proteinturnovers. Hauptverantwortlich für die Glucoseausschüttung aus der Leber scheint das Glucagon zu sein - in der isoliert perfundierten Leber stimuliert es sowohl Glycogenolyse wie Gluconeogenese (zur Übersicht siehe Ref. 8). Die hierzu erforderlichen Glucagonkonzentrationen liegen im Bereich der in der Pfortader in vivo gemessenen Werte (9). Mit zyklischem AMP vermag man Glucagoneffekte an der perfundierten Leber nachzuahmen, umgekehrt verursacht Glucagon einen der Glucoseausschüttung unmittelbar vorausgehenden Anstieg des

zellulären cAMP-Gehaltes (10,9). Man nimmt deshalb an, daß Glucagon, ähnlich wie viele andere Hormone in zahlreichen Geweben und bei den verschiedensten Spezies das an die Plasmamembran gebundene Adenylatzyklase-System stimuliert, die durch Glucagon bewirkten Änderungen im Zellstoffwechsel dagegen ausschließlich vom zyklischen Nucleotid als "second messenger" verursacht werden (8). Neuerdings wird in Ergänzung hierzu die Möglichkeit diskutiert, daß cAMP in der Leberzelle zum größten Teil in gebundener Form gespeichert wird, und daß Glucagon den Spiegel des freien, physiologisch aktiven Nucleotids erhöht, während ihn z.B. Insulin senkt (11). Im Gegensatz zu den eben genannten Hormonen, zu denen noch Adrenalin mit einer Glucagon-ähnlichen Wirkung zu rechnen ist, scheinen die Schilddrüsen- und Nebennierenrindenhormone keine direkte Beziehung zum zellulären cAMP zu haben. Ihre Funktion wird als "permissiv" bezeichnet, d.h. die Voraussetzungen schaffend, daß die Zelle in physiologischer Weise auf cAMP anzusprechen vermag (8).

Glucagon bzw. cAMP zeigen im übrigen an der Leber neben der Stimulierung von Glycogenolyse und Gluconeogenese eine Vielzahl weiterer Effekte, die im folgenden kurz zusammengefaßt seien: Hemmung der Glycogensynthese, Aktivierung der Lipolyse und Ketogenese, der Aminosäure-Aufnahme, Proteolyse und Harnstoffbildung, Stimulierung der Histon-Phosphorylierung und Induktion verschiedener Enzyme, Änderung von Ionenflüssen und Membranpotential, Hemmung der Triglycerid- und Cholesterin-freisetzung, Änderung der morphologischen Feinstruktur der Zelle, Steigerung der mechanischen und osmotischen Fragilität und der Größe von Lysosomen (zur Übersicht siehe Ref. 8). Zurück zur Gluconeogenese und ihrer hormonalen Regulation. Auf Grund von Aktivitätsmessungen gluconeogener Enzyme unter verschiedenen diätetischen Bedingungen und der Bestimmung ihrer kinetischen Eigenschaften wurden die Reaktionsschritte zwischen Lactat, Pyruvat und Phosphoenolpyruvat sowie zwischen den Hexose-di- und monophosphaten als Schlüsselstellen der Gluconeogenese postuliert. Substratverfügbarkeit, Phosphat- und Wasserstoffpotentiale und allosterisch wirksame Metabolite

wurden im Hinblick auf eine regulatorische Bedeutung für diese Enzyme diskutiert. Von einem mathematischen Modell ausgehend wurden Zyklen mit quasi ATPase-Funktion (sogenannte "Futile cycles", siehe Abb. 1), die sich formal aus einer Abfolge mehrerer thermodynamisch irreversibler Reaktionen ergeben, als Orte einer sehr empfindlichen Feinregulation konzipiert (4,2,7).

Relativ kleine Gluconeogeneseraten aus Substraten wie Lactat, Pyruvat und Alanin, die durch Glucagon gesteigert werden konnten, gegenüber wesentlich höheren Raten aus Fructose und Dihydroxyacetonphosphat ohne weitere Stimulierbarkeit durch das Hormon (12,13,14,1) konzentrierten die Suche nach der geschwindigkeitslimitierenden Schlüsselstelle auf die Reaktionsfolge vor den Triosephosphaten. Die Bestimmung der Gewebegehalte von Metaboliten der Gluconeogenese unter verschiedensten Bedingungen wie Diabetes, Fasten, nach Adrenalektomie, nach Glucagon-, cAMP- oder Adrenalingabe und mit verschiedensten Substraten zeigten jeweils einen "cross over point" zwischen Pyruvat und Phosphoenolpyruvat (15,1), ein weiterer Hinweis für die Schlüssel-funktion dieser Reaktionsfolge.

Dieser Teilabschnitt der Gluconeogenese, dem von den meisten Forschergruppen übereinstimmend eine Kontrollfunktion über den Gesamtfluß zugeschrieben wird, läßt sich in folgende Einzelschritte untergliedern. Dabei werden Hormoneffekte, soweit bekannt, summarisch erwähnt.

1.) Permeation des Substrates durch die Plasmamembran der Leberzelle. Lactat und Pyruvat scheinen genügend rasch zu permeieren, dagegen gibt es Hinweise für einen limitierten Aminosäure-Transport, der durch Glucagon beschleunigt werden kann (16).

2.) Umwandlung des Substrates (Alanin, Lactat) mit Hilfe cytosolischer Enzyme in Pyruvat, den eigentlichen Precursor für die Gluconeogenese. Kein Hinweis für eine hormonale Beeinflussung.

3.) Transfer von Pyruvat in die Mitochondrien, den Ort der Pyruvatcarboxylierung. Hinweise für einen limitierten, carrier abhängigen Transport (17,18) und eine durch Glucagon beschleunigte Aufnahme (19).

4.) Umwandlung von Pyruvat zu Oxalacetat durch die Pyruvatcarboxylase (PC). Diese Reaktion wurde in den vergangenen Jahren vielfach als eigentliche Schlüsselreaktion der Gluconeogenese betrachtet (4,2). Nachdem bereits sehr früh an Leberschnitten die ketogene Wirkung von Glucagon gezeigt worden war (20), und UTTER eine allosterische Aktivierung der PC durch Acetyl-CoA nachweisen konnte (21), wurde konsequent nach einer Beziehung zwischen lipolytischer und gluconeogener Wirkung von Glucagon gesucht. STRUCK et al. konnten eine dem Glucagon vergleichbare Wirkung von Fettsäuren auf die Gluconeogenese zeigen und vermuteten deshalb, daß der Glucagoneffekt auf einer Lipaseaktivierung beruhe. Durch erhöhte β -Oxidation und Anstieg des Acetyl-CoA-Spiegels sollte die PC aktiviert, die Pyruvatoxidation dagegen inhibiert werden (22). WILLIAMSON et al. beobachteten einen Anstieg der Leberspiegel von Acetyl-CoA und Acyl-CoA nach Glucagongabe in vivo, später dann auch nach Fettsäuregabe bei gleichzeitigem Anstieg der Gluconeogenese in der perfundierten Leber. Durch Hemmung der Fettsäureoxidation konnten diese Veränderungen jeweils wieder rückgängig gemacht werden (23,24). Als es schließlich gelang, eine Leberlipase direkt durch Glucagon zu stimulieren, meinte man den endgültigen Nachweis der Hormonwirkung erbracht zu haben (25,26). In jüngster Zeit wurden allerdings mehrfach Zweifel an der physiologischen Bedeutung der geschilderten Fettsäureeffekte und einem notwendigen Zusammenhang zwischen ketogener und gluconeogener Wirkung von Glucagon geäußert (27,28).

Die Rattenleber-PC weist in vitro sehr komplexe kinetische Eigenschaften auf. Ihre Aktivität wird einerseits durch Substrat- und Aktivatorkonzentration (Pyruvat bzw. Acetyl-CoA) bestimmt, andererseits durch den pH und die Konzentration von HCO_3^- , MgATP^{2-} , freiem Mg^{++} und Ca^{++} stark modifiziert. Im übrigen

zeigt Acetoacetyl-CoA, das das Hühnerleber-Enzym hemmt, an der Rattenleber-PC keine Wirkung (29). Es war nämlich mehrfach eine De-Inhibition der PC durch Negativierung des mitochondrialen Wasserstoffpotentials mit Senkung der Acetoacetyl-CoA-Konzentration im Zusammenhang mit den Fettsäureeffekten diskutiert worden. Insgesamt ist eine Übertragung all solcher in vitro-Befunde auf physiologische Bedingungen sehr problematisch, vor allem, wenn dabei Kompartimentierungsfragen wie z.B. bei Gehaltsbestimmungen in der Gesamtleber außer acht gelassen werden. Hinweise für verschiedene Mitochondrientypen innerhalb einer Zelle und eine Kompartimentierung des Acetyl-CoA-Pools innerhalb der Mitochondrien (30) mögen stellvertretend diese Problematik verdeutlichen.

5.) Konkurrenz der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase (PDH) mit der PC um das gemeinsame Substrat. Das interkonvertible System der PDH soll in der Leber unter Gluconeogenesebedingungen weitgehend in inaktiver Form vorliegen und deshalb nur unerheblich am Pyruvatstoffwechsel beteiligt sein (31). Direkte Hormoneffekte sind nicht bekannt.

6.) Interaktion des Citratzyklus mit der Gluconeogenese über den gemeinsamen Metaboliten Oxalacetat. Die sehr komplexe Regulation des Citratzyklus unter Gluconeogenesebedingungen wurde ausführlich von NEWSHOLME et al. und WILLIAMSON et al. diskutiert (4,32,33). Sie soll im wesentlichen über das Wasserstoff- und Phosphatpotential erfolgen. Über Citrat als allosterischem Inhibitor der 6-Phosphofructokinase (PFK) ist darüber hinaus eine Regulation des "Futile cycle 2" (siehe Abb. 1) durch den Citratzyklus denkbar. REGEN et al. beobachteten eine Stimulierung der Citratbildung durch Glucagon um ca. 100 %, allerdings beim gefütterten Tier und in Abwesenheit eines gluconeogenen Substrates (34). UI et al. postulierten eine stimulatorische Wirkung von Glucagon auf die Metabolisierung von L-Ketoglutarat im Citratzyklus (35).

7.) Transfer von Oxalacetat aus den Mitochondrien ins Cytosol. Dieser Punkt soll ausführlich im Zusammenhang mit Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert werden, deshalb sei hier nur kurz seine regulatorische Bedeutung und möglicherweise eine Beeinflussbarkeit durch Glucagon bzw. cAMP hingewiesen.

8.) Konkurrenz der cytosolischen Malic enzyme-Reaktion mit der Gluconeogenese um Malat. Über diese Reaktion ist im Zusammenhang mit der Gluconeogenese nur wenig bekannt, das Enzym scheint unter Gluconeogenesebedingungen relativ inaktiv zu sein (36). SCHOLZ et al. konnten durch Aktivierung eines NADPH-verbrauchenden Systems, der mikrosomalen Oxidase, einen erhöhten Fluß über das Malic enzyme und eine Hemmung der Gluconeogenese erzielen (37). Glucagoneffekte sind nicht beschrieben.

9.) Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) in der PEPCK-Reaktion. Obwohl diese Reaktion seit jeher zu den Schlüsselstellen der Gluconeogenese gerechnet wird (4,2), fehlen hierfür bis heute eindeutige Beweise. Kürzlich schlossen UI et al. aus ihren allerdings sehr problematischen Isotopenexperimenten, daß die PEPCK durch Glucagon aktiviert wird (38).

10.) Konkurrenz der Pyruvatkinase mit der Gluconeogenese um das gemeinsame Substrat PEP. Von FRIEDMAN et al. konnte unter Gluconeogenesebedingungen ein beträchtlicher Rückfluß von PEP zu Pyruvat nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Rückfluß zu Gluconeogenese betrug bei gefütterten Ratten etwa 4:1, bei gehungerten 1:2 (39). WILLIAMSON et al. diskutierten die funktionelle Bedeutung dieses "Futile cycle" für die Gluconeogenese sowie mögliche Regulationsmechanismen (40). Direkte Glucagoneffekte sind bisher nicht beschrieben worden. In Perfusionsexperimenten mit Fructose und Dihydroxyaceton (DOA) als Substrat konnten EXTON et al. zeigen, daß die Lactatbildung nach Glucagongabe unverändert blieb, sie schlossen daraus, daß das Hormon den "Futile cycle" nicht beeinflusst (15). BLAIR et al. erzielten dagegen kürzlich eine Stimulierung der Gluconeogenese aus DOA und Xylit durch Glucagon, wobei die Lactatbildung deutlich zurückging (41).

Es wurde versucht, den Leser in die Komplexität des Themas einzuführen und einen kurzen Überblick über den derzeitigen Stand der Diskussion zum Komplex "hormonale Regulation der Gluconeogenese" zu geben. Ziel der im folgenden beschriebenen Versuche war es, mit Hilfe von Isotopentechniken einige zelluläre Ereignisse während der hormonstimulierten Gluconeogenese zu charakterisieren und früheren Untersuchungsergebnissen dieses Arbeitskreises (42-44,30) gegenüberzustellen. Durch Verwendung eines positionsspezifisch markierten Substrates, 2-³H-2-¹⁴C-Lactats, sollten mit Hilfe einer Analyse der Aktivitätsverteilung in der neugebildeten Glucose vor und nach Hormongabe sowie in einigen zellulären Metaboliten der Gluconeogenese Rückschlüsse auf Veränderungen des Wasserstoff- und Kohlenstoffmetabolismus gezogen werden. Zur Stimulierung der Gluconeogenese wurde an Stelle des physiologischen Hormons Glucagon ein azyliertes Derivat des zyklischen AMP, das N⁶-2'-O-dibutyryl-cAMP (DBcAMP) verwendet. Es zeigt in der Leber eine dem Glucagon vergleichbare Wirkung, soll im Unterschied zu dem natürlich vorkommenden Nucleotid biologische Membranen leicht penetrieren und gegenüber der Diesterasespaltung weitgehend resistent sein (zur Übersicht Ref. 8).

Als Versuchsobjekt wurde das Modell der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber gewählt. Wegen Fehlens eines physiologischen Sauerstoffträgers erfordert diese Methode hohe Perfusionsraten, die bei längerer Versuchsdauer zu einer ödematösen Anschwellung der Leber führen können. Um die metabolische Aktivität und damit den O₂-Bedarf zu senken, wurde bei niederen Temperaturen (32 - 33⁶C) perfundiert. Um konstante Ausgangsbedingungen während des Experiments sicherzustellen und insbesondere nennenswerte Aktivitätsverschiebungen durch Isotopen -Austauschprozesse zu vermeiden, wurden die Perfusionen in den entscheidenden Phasen im offenen, nicht - zirkulierenden System durchgeführt.

In Anbetracht seines artifiziellen Charakters wurde unser Versuchsmodell zunächst in inaktiven Vorversuchen hinsichtlich seiner metabolischen Leistungsfähigkeit und hormonalen Ansprech-

barkeit geprüft. Dabei wurde neben Lactat auch Pyruvat als glucogenes Substrat verwendet. DBcAMP konnte unter unseren Versuchsbedingungen die Gluconeogenese aus Lactat beschleunigen, in Gegenwart von Pyruvat war es dagegen wirkungslos. Deshalb wurden die folgenden Isotopenversuche nur mit Lactat durchgeführt. Das zyklische Nucleotid verursachte hier im wesentlichen nur eine Änderung im Markierungsmuster der Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie des $\mathcal{L}$ -Glycerophosphats. Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit Kompartimentierungsproblemen sowie Fragen des Wasserstoff- und Kohlenstofftransportes über biologische Membranen diskutiert. Ausgehend von neueren ergänzenden Untersuchungen unseres Arbeitskreises wird die stimulierende Wirkung von cAMP auf die Gluconeogenese unter dem Aspekt des zellulären Wasserstoffpotentials betrachtet. Dabei wird dem Glycerophosphatzyklus eine zentrale Bedeutung zuerkannt.

2. Methodik

2.1. Technik der Leberperfusion

2.1.1. Tiermaterial

Männliche Albinoratten vom Stamm Wistar FW 49, Körpergewicht 150 - 250 g (Fa. Thomae GmbH, Biberach/Riss), gefüttert mit einer Standardnahrung (Altrumin R, Fa. Altrogge, Lage/Lippe), wurden 48 h vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt (Wasser ad libidum). Nach Heparinisierung mit 0,1 ml Liquemin i.v. wurden in Nembutal-Narkose (Pentobarbital-Na, 5 mg/100 g Körpergewicht) die Lebern nach der von SCHOLZ angegebenen Methode präpariert und extracorporal in einem künstlichen System hämoglobinfrei perfundiert (45).

2.1.2. Perfusionsmedium

Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (46) mit 7 g% onkotisch aktivem Dextran (Rheomakrodex, mittleres Molekulargewicht 40 000, Fa. Knoll AG, Ludwigshafen) wurde kurz vor Gebrauch filtriert (Millipore-Celluloseacetat-Filter, Porenweite 0,45 μ), in einem Oxygenator mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 bei Wasserdampfsättigung äquilibriert und dabei auf einen pH von 7,4 gebracht. Das Medium wurde bei 33 °C thermostatisiert und mit einer mittleren Geschwindigkeit von 25 ml/min mit Hilfe einer Rollpumpe perfundiert. Im Perfusionsmedium vor und hinter der Leber wurde mit einer Platinelektrode kontinuierlich die O_2 -Spannung registriert, aus der arteriovenösen Differenz wurde die Sauerstoffaufnahme ermittelt (47).

2.1.3. Perfusionsverlauf

Zu Beginn eines Experiments wurden die Lebern 30 Min. lang rezirkulierend ohne Substrat perfundiert. Erfahrungsgemäß wurde während dieser Zeit Restglycogen nahezu vollständig abgebaut, die dabei entstandenen Produkte wurden in den folgenden 10 Min. bei offener Perfusion mit frischem substrat-

freiem Medium ausgewaschen. Anschließend wurde nicht-rezirkulierend Substratmedium (Lactat oder Pyruvat, jeweils 5 mM) perfundiert, zunächst 10 Min. ohne DBcAMP, dann weitere 10 Min. mit 80 μ M zyklischem Nucleotid. Die Versuche wurden meist mit einem Frierestopp (48) bei noch laufender Perfusionspumpe mit einer geriffelten, in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumzange (Stanzdicke weniger als 2 mm) beendet.

Den Substratmedien waren in einigen Versuchen Tracermengen von 2-³H-2-¹⁴C-L-Lactat beigegeben.

2.2. Chemikalien, Enzyme und Coenzyme, radioaktiv markierte Verbindungen

L-Fleischmilchsäure 40 % in wässriger Lösung und Na-L-Lactat von Fa. Roth OHG, Karlsruhe; Na-Pyruvat von Fa. Merck AG, Darmstadt; Ionenaustauscher Dowex 50x8, 200 - 400 mesh, H⁺-Form pract. und Dowex 1x8, 200 - 400 mesh, Cl⁻-Form pract. von Fa. Serva, Heidelberg. Durch mehrmaliges Waschen mit 3M Salzlösungen wurde die Chloridform in die Acetat- bzw. Formiatform überführt.

Alle verwendeten Enzyme und Coenzyme sowie N⁶-2'-O-di-butyryl-Adenosin-3':5'-Monophosphat (DBcAMP) von Fa.

Boehringer GmbH, Mannheim.

2-¹⁴C-Pyruvat-Na von Radiochemical Center, Amersham, England. 2-¹⁴C-L-Lactat wurde aus ¹⁴C-Pyruvat durch enzymatische Reduktion mit NADH und Lactatdehydrogenase hergestellt und durch Chromatographie an Dowex-Chlorid gereinigt (linear ansteigender Säuregradient, je 200 ml H₂O und 0,1 N HCl). 2-³H-L-Lactat wurde aus 2-³H-D,L-Acetylalanin (Amersham) nach HOBERMANN synthetisiert (49,52) und chromatographisch gereinigt. Später wurde es auch durch Reduktion von Na-Pyruvat mit tritiiertem Borhydrid (NaB-³H₄, Amersham) zu 2-³H-D,L-Lactat und enzymatischer Abtrennung des D-Isomers mit Hilfe einer D-spezifischen Lactatdehydrogenase hergestellt und wie oben gereinigt.

2.3. Radioaktivitätsmessungen und Konzentrationsbestimmungen

Die Radioaktivität der Eluate von Ionenaustauschern wurde kontinuierlich mit einem Durchflußzähler (Tri Carb Flow Analyser, Model 3021, Fa. Packard, USA), registriert. Die markierten Proben wurden vereinigt, unter reduziertem Dampfdruck zur Trockne gebracht (Rotationsverdampfer Rotavapor R, Fa. Büchi, Schweiz) und in einem kleinen Volumen H_2O aufgenommen. Größere Verluste beim Eindampfen flüchtiger Säuren (Milchsäure, Brenztraubensäure, β -Hydroxybuttersäure) konnten durch Überführung der Säuren in die nichtflüchtige Salzform nach Zugabe kleiner Mengen Na-Bicarbonat vermieden werden.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität gereinigter Verbindungen erfolgte durch Radioaktivitätsmessung in einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer (Model 3003, Fa. Packard, USA) und der nach Standardmethoden durchgeführten Konzentrationsbestimmung im optischen Test (50). Als Szintillationslösung wurde eine Mischung von Toluol und Methanol (2:1, Vol:Vol) verwendet. Der Toluollösung waren 5 g 2,5-Diphenyloxazol und 0,25 g Dimethyl-(1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol) je Liter zugesetzt.

Die Simultanbestimmung von Tritium und ^{14}C erfolgte nach einem von HEMPEL angegebenen Verfahren (51), eine Quenchkorrektur war nicht erforderlich.

Abweichend von dem bei BERGMAYER angegebenen Verfahren (50) wurde Fumarat direkt in einem zusammengesetzten optischen Test bestimmt (O. KUNTZEN, persönliche Mitteilung).

2.4. Venöses Perfusat

2.4.1. Produktions- und Verbrauchsraten von Metaboliten

Dem aus der Vena hepatica strömenden Perfusionsmedium wurden zu verschiedenen Zeiten Proben zu 1 ml entnommen, mit 0,2 ml einer 2 M Perchlorsäure dekantiert und mit 0,18 ml K_2CO_3 in Triäthanolaminhydrochlorid (je 1,6 M) neutralisiert. Nach

Zentrifugieren wurden im Überstand die Konzentrationen von Glucose, Pyruvat, Lactat, Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat und Harnstoff enzymatisch bestimmt (50). Mit arteriellen Proben, die vor der Leber entnommen wurden, wurde in gleicher Weise verfahren. Aus der arteriovenösen Konzentrationsdifferenz und der Durchflußgeschwindigkeit wurden Produktions- und Verbrauchsdaten errechnet.

2.4.2. Isolierung von radioaktiven Metaboliten

In Versuchen mit markierten Substraten wurde das gesamte venöse Perfusat der letzten 2 Perfusionsminuten ohne bzw. mit DBcAMP in 10 ml-Portionen gesammelt, mit jeweils 2 ml Perchlorsäure versetzt, neutralisiert und zentrifugiert (siehe 2.4.1.).

Zur Dextranfällung wurde der Überstand mit Methanol versetzt (1:2, Vol:Vol) und erneut zentrifugiert. Der Dextranfreie Überstand wurde unter reduziertem Dampfdruck eingengt und zur Abtrennung von Kationen an Dowex 50, H^+ gereinigt. Das Eluat wurde nach Einengung an Dowex 1x8, Formiat chromatographiert (exponentiell ansteigender Säuregradient, 250 ml H_2O , 250 ml H_2O , 250 ml 6 N Ameisensäure), dabei wurden Glucose, β -Hydroxybutyrat, Lactat und Pyruvat voneinander getrennt. Pyruvat wurde enzymatisch zu Lactat umgesetzt und an Dowex Chlorid rechromatographiert (siehe 2.2.).

2.4.3. Tritium-Austausch ins Wasser

Zur Bestimmung der Tritium-Austauschraten in Experimenten mit $2-^3H$ -Lactat wurden Aliquots des venösen Perfusates nach Dextranfällung (siehe 2.4.2.) ausgezählt und anschließend lyophilisiert. Aus der Tritiumaktivität des Lyophilisationswassers, der spezifischen Aktivität des arteriellen Lactats und der Perfusionsgeschwindigkeit wurden die Austausch- bzw. 3HOH -Bildungsraten errechnet.

2.5. Tritium- und ^{14}C -Markierung der Glucose im venösen Perfusat

Die nach 2.4.2. isolierte, im wässrigen Eluat erscheinende und noch mit anderen apolaren Substanzen wie Glycerin ver-

unreinigte Glucose wurde durch spezifische enzymatische Umwandlung zu Fructose-1,6-diP (FDP) und Rechromatographie gereinigt und über mehrere Stufen abgebaut. Die wesentlichen Schritte seien hier kurz erwähnt, eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens findet sich bei HESSE (44).

2.5.1. Umsetzung der Glucose zu FDP in Gegenwart der Glycolyseenzyme Hexokinase, Phosphohexoseisomerase und 6-Phosphofructokinase sowie ATP in katalytischen Mengen, Creatinphosphat, Creatinkinase und Magnesiumionen bei neutralem pH. Chromatographie an Dowex 1x8, Cl^- (linear ansteigender Säuregradient, je 120 ml H_2O und 0,2 N HCl).

2.5.2. Inkubation eines Aliquots des gereinigten FDP bei pH 7,6 mit den Enzymen Aldolase und Triosephosphatisomerase. Tritium der C-Position 3, 4 und 5 tauscht dabei quantitativ mit Wasser aus und wird nach Lyophilisation als ^3HOH bestimmt.

2.5.3. Spaltung von FDP mit Aldolase (frei von Triosephosphatisomerase-Verunreinigung) in Dihydroxyacetonphosphat (DAP) und Glyceraldehydphosphat (GAP), Umwandlung des GAP in Gegenwart von Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH), NAD und Arsenat bei neutralem pH in 3-Phosphoglycerat (3-PGS). Tritium der C_4 -Position wird in der Dehydrogenasereaktion an NAD gebunden und im gleichen Ansatz in Gegenwart von Glutamatdehydrogenase und Ammoniumionen auf zugesetztes α -Ketoglutarat übertragen. Beide Dehydrogenasen haben die gleiche Stereospezifität für NAD (B-seitig).

Trennung der Reaktionsprodukte Glutamat, DAP und 3-PGS an Dowex Chlorid (linear ansteigender Säuregradient, je 200 ml H_2O und 0,1 N HCl). Rechromatographie von Glutamat an Dowex Acetat (siehe 2.7.2.).

DAP wurde in Gegenwart von Triosephosphatisomerase zu GAP umgewandelt und in identischer Weise zu 3-PGS umgesetzt.

2.5.4. Dephosphorylierung der 3-PGS durch saure Phosphatase in Acetatpuffer bei pH 5,5, Abtrennung von Glycerat an Dowex

Acetat (Elution mit 4 N Essigsäure). Oxidation von Glycerat mit Perjodsäure bei saurem pH unter Eiskühlung zu Glyoxylat und CO_2 , Abtrennung von Glyoxylat an Dowex Acetat. In einem anderen Verfahren wurde 3-PGS in Lactat überführt und weiter zu Acetaldehyd umgesetzt (siehe 2.7.5. und 2.8.4.).

2.5.5. Oxidation von Glyoxylat bei neutralem pH mit H_2O_2 zu Formiat und CO_2 . Durch Ansäuern und Zugabe von Trocken-eis Austreibung von markiertem CO_2 , nach Neutralisierung Bestimmung der in der Inkubation verbliebenen und damit im Formiat lokalisierten Radioaktivität.

In Tabelle 1 sind die in den einzelnen Schritten des Glucoseabbaus bestimmten Tritium- und ^{14}C -Positionen zusammengefaßt.

Tabelle 1

Derivate des Glucoseabbaus, deren spezifische Aktivität bestimmt wurde, und die ihnen entsprechenden Kohlenstoff- und Wasserstoffpositionen der ursprünglichen Glucose.

Derivat	enthält C-Atome folgender Positionen der Glucose	enthält H-Atome folgender Positionen der Glucose
Glucose	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6, 6'
Fructose-1,6-diP	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 3, 4, 5, 6, 6'
^3HOH	- -	3, 4, 5
Dihydroxyaceton-P	1, 2, 3	1, 3, 6'
3-Phosphoglycerat	4, 5, 6	5, 6, 6'
Glutamat	- -	4
Glyoxylat	4, 5 bzw. 2, 3	5
Formiat	5 bzw. 2	5
Acetaldehyd	5, 6 bzw. 1, 2	6, 6' bzw. 1

2.6. Gewebeextrakt

Die friergestoppte Leber (siehe 2.1.3.) wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zerrieben, in 2 g-Portionen abgewogen und mit je 10 ml tiefgekühlter 6 % Perchlorsäure in 40 % Äthanol extrahiert. Anschließend Homogenisierung je 3 x 10 Sec. (Gewebehomogenisator Ultra Turrax Typ 18/2, 200 Upm, Fa. Janke u. Kunkel KG, Staufen i.Br.) und Ultrabeschallung je 5 x 10 Sec. lang (Branson Sonifier, Model LS - 75, 20 kHz, Branson Instruments, USA). Ein Aliquot des zermörserten Gewebes wurde zur Frisch- und Trockengewichtsbestimmung abgewogen, 2 Tage bei 90 °C getrocknet und erneut gewogen.

Die homogenisierten Proben wurden 10 Min. bei 12 000 g zentrifugiert (Sorvall RC2-B, Sorvall Inc., USA) und mit 6 N KOH vorsichtig auf pH 6,0 - 6,5 neutralisiert. Das ausgefällte $KClO_4$ wurde abzentrifugiert, der Überstand wurde zur Trockne lyophilisiert, in 6 - 10 ml H_2O aufgenommen und erneut zentrifugiert (je 10 Min. bei 12 000 g). Im Überstand wurden die Metabolitkonzentrationen nach Standardmethoden bestimmt (50). Der überwiegende Teil des Leberextraktes wurde zur chromatographischen Auftrennung und Reinigung einiger Metabolite weiterverwendet.

2.7. Isolierung und Reinigung von Metaboliten des Gewebeextraktes

Eine grobe Erstauftrennung des Extraktes erfolgte durch Ionenaustauscherchromatographie an Dowex Formiat mit einem exponentiell ansteigenden Säuregradienten nach HOBERMANN (52). Einzelheiten gehen aus Abb. 2 hervor.

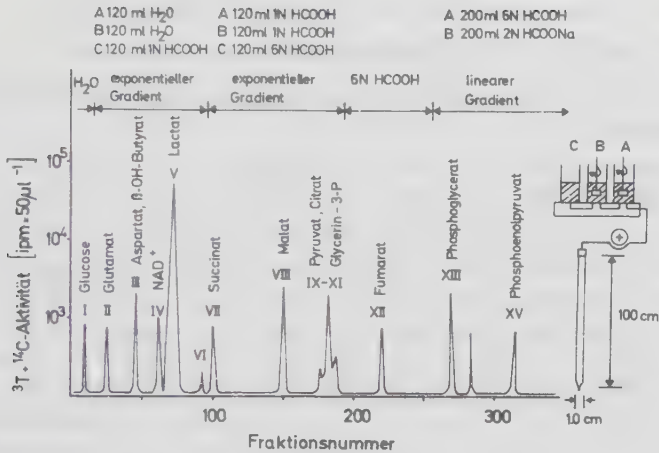


Abb. 2. Trennung von Metaboliten des Extraktes an Dowex 1 x 8 Formiat.

Austauscher 200 - 400 mesh, Säule 100 x 1,0 cm, Elutionsgeschwindigkeit 0,6 ml/Min., Fraktionen zu 4 ml. Auf der Abszisse sind die Fraktionsnummern, auf der Ordinate logarithmisch Radioaktivitäten im Eluat aufgetragen. Im rechten Teil der Abb. schematisch der Gradientenmischer mit den Kammern A, B, C und die Säule, über dem Chromatogramm die den einzelnen Elutionsphasen zugeordneten Säuregradienten. Das Chromatogramm stammt aus einem Experiment mit 2-³H-2-¹⁴C-Lactat als Substrat.

Zur groben Orientierung und Beurteilung der Trennungsgüte wurde vom Eluat routinemäßig ein Nucleotid-Absorptionsspektrum bei 260 nm mitgeschrieben (Uvicord, Type 4701 A, LKB-Producter AB, Schweden).

Um die Metabolite mit ausreichendem Reinheitsgrad zu erhalten, waren zusätzliche Reinigungsschritte notwendig (42-44,30).

2.7.1. Glutamat, Peak II

Glutamat ließ sich in der Regel sauber von den folgenden Substanzen abtrennen, bei Überlappen mit anderen Peaks wurde es nach 2.7.2. weitergereinigt.

2.7.2. Aspartat, β -Hydroxybutyrat(β -OH-Butyrat) und NAD Peak III und IV

Diese Metabolite konnten nach Einengung des Eluates unter reduziertem Druck durch Rechromatographie an Dowex Acetat mit einem linear ansteigenden Säuregradienten (je 300 ml H_2O und 0,7 N Essigsäure) aufgetrennt werden (53). Aspartat mußte meist noch zusätzlich an einem Kationenaustauscher (Dowex 50, H^+) von Carbonsäuren gereinigt werden.

2.7.3. Lactat, Malat und Fumarat, Peak V, VIII und XII

Diese Metabolite wurden als rein angenommen (44) und keinen weiteren Trennungsschritten unterzogen. Bei der späteren Aufspaltung von Malat und Fumarat (siehe 2.8.1.) konnte jeweils ihre Reinheit bestätigt werden.

2.7.4. Pyruvat, Citrat und α -Glycerophosphat(Glycerin-3-P), Peak IX - XI

Diese Substanzen lassen sich nicht genügend sauber auftrennen, wahrscheinlich sind im α -GP auch noch Spuren von Zuckermonophosphaten enthalten. Pyruvat wurde enzymatisch in Lactat überführt und an Dowex Chlorid rechromatographiert (siehe 2.2.). α -GP wurde durch Inkubation mit saurer Phosphatase in Gegenwart von Magnesiumionen bei pH 5,5 (Acetatpuffer) dephosphoryliert und als Glycerin an Dowex Chlorid (linear ansteigender Säuregradient, je 300 ml H_2O und 0,1 N HCl) von Citrat abgetrennt. Glycerin wurde nach spezifischer Rephosphorylierung mit Glycerokinase und ATP bei neutralem pH in Gegenwart von Mg^{++} als α -GP an Dowex Cl^- (gleicher Gradient wie oben) von dephosphorylierten Zuckern abgetrennt. Citrat wurde schließlich durch Papierchromatographie (Papier Whatman 3 MM, Elution mit 6 N Ameisensäure und n-Amylalkohol 1:1, Vol:Vol, absteigend) gereinigt. Die Lokalisierung er-

folgte mit Hilfe nicht-markierten Citrats als Referenz und Anfärbung mit einem Sprühreagenz (pH-Indikator Bromkresolgrün 0,04 % in Isopropanol, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt).

2.7.5. Phosphoglycerat (PGS) und Phosphoenolpyruvat (PEP), Peak XIII und XV

PGS war verunreinigt mit nicht-identifizierten Substanzen. Es wurde deshalb mit Hilfe der Glycolyseenzyme Phosphoglyceratmutase, Enolase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase in Gegenwart der Co-Enzyme ADP und NADH, 2,3-diPGS, K^+ und Mg^{++} bei neutralem pH zu Lactat umgesetzt und an Dowex Chlorid gereinigt (Gradient siehe 2.2.). Dabei war zu beachten, daß nur katalytische Mengen von 2,3-diPGS verwendet wurden, um eine stärkere Verdünnung der spezifischen Aktivität von 2-PGS durch kaltes Co-Substrat zu vermeiden.

Durch getrennten Umsatz zuerst von 2-PGS zu Lactat mit chromatographischer Trennung und anschließend von 3-PGS konnten die Phosphoglycerinsäuren differenziert werden.

PEP war gewöhnlich rein, wurde aber ebenfalls routinemäßig in Lactat überführt.

2.8. Analyse der Tritium- und ^{14}C -Verteilung in den gereinigten Metaboliten

2.8.1. Malat, Fumarat

Die Tritiumaktivität der 2-Stellung im Malat (Malatdehydrogenase-Position) wurde durch spezifische enzymatische Übertragung des Wasserstoffs über NADH auf Pyruvat in dem dabei gebildeten Lactat bestimmt. Hierzu wurde Malat bei neutralem pH mit Malatdehydrogenase, NAD, Acetyl-CoA und Citratsynthetase in Citrat überführt. Mit dem dabei entstandenen tritiierten NADH wurde Pyruvat nach Zugabe von Lactatdehydrogenase in 2- 3H -Lactat überführt. Die Reaktionsprodukte wurden an Dowex Formiat getrennt (linear ansteigender Säuregradient, je 300 ml H_2O und 6 N Ameisensäure).

Die spezifischen Tritiumaktivitäten von Lactat und Citrat entsprechen der 2- bzw. 3-Position im Malat.

Citrat wurde weiter mit Aconitase⁺), Isocitratdehydrogenase (IDH) und NAD bei neutralem pH in Gegenwart von Manganionen zu α -Ketoglutarat umgesetzt und mit dem dabei entstandenen NADH durch Zugabe von Ammoniumionen und Glutamatdehydrogenase in Glutamat überführt. Glutamat wurde wie oben beschrieben (siehe 2.7.2.) gereinigt, seine spezifische Aktivität entspricht der ^{14}C -Aktivität der Positionen 2,3 und 4 im Malat (Abspaltung der C_1 -Carboxylgruppe in der IDH-Reaktion). Durch Spaltung von Citrat mit Citratlyase bei neutralem pH in Gegenwart von Zinkionen zu Oxalacetat, Decarboxylierung zu Pyruvat (eine Oxalacetatdecarboxylase ist als Verunreinigung in älteren Citratlyase-Chargen der Fa. Boehringer enthalten) und weiteren Umsatz zu Lactat konnte die spezifische ^{14}C -Aktivität der Positionen 1, 2 und 3 im Malat (Abspaltung der C_4 -Carboxylgruppe in der Decarboxylase-Reaktion) bestimmt werden.

Fumarat konnte in der gleichen Weise durch Zugabe von Fumarasase umgesetzt und abgebaut werden.

2.8.2. α -Glycerophosphat (α -GP)

Zur Bestimmung der Tritiumverteilung wurde α -GP mit NAD, Glycerophosphatdehydrogenase (GDH) und Aldolase bei neutralem pH inkubiert. Dabei wird Tritium am C-Atom 1 auf der Stufe des Dihydroxyacetonphosphats mit Wasser ausgetauscht (54). Durch Zugabe von α -Ketoglutarat, Ammoniumionen und Glutamatdehydrogenase wurde Tritium vom C-Atom 2 (GDH-Position) über NADH auf das dabei entstandene Glutamat übertragen. Es ist zu beachten, daß die Dehydrogenase-spezifischen Wasserstoffübertragungen mit gleichseitig spezifischen Enzymen erfolgen. Die bei der eben beschriebenen Transhydrogenierung verwendeten Enzyme sind B-seitig spezifisch für NAD, die beim Malatabbau (2.8.1.) dagegen A-seitig spezifisch (55). Nach Lyophilisierung wurde die Tritiumaktivität der C_1 -Position im Lyophilisationswasser bestimmt, das bei der Reaktion entstandene 2- ^3H -Glutamat wurde an Dowex Acetat gereinigt (siehe 2.7.2.).

⁺) Aconitase aus Rinderherz wurde von Herrn Dr. O. Kuntzen präpariert.

2.8.3. Citrat

Citrat wurde mit Citratlyase in Oxalacetat und Acetat gespalten, Oxalacetat wurde mit Malatdehydrogenase und NADH in Malat überführt und an Dowex Formiat gereinigt (siehe 2.8.1.).

2.8.4. Lactat

Verschiedene Lactate wurden zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in der Carboxylgruppe mit Kaliumpermanganat zu CO_2 und Acetat oder mit Cer(IV)-Sulfat zu CO_2 und Acetaldehyd oxidiert (56,57). Die im CO_2 enthaltene Aktivität wurde aus der Differenz der eingesetzten und der nach Austreibung des CO_2 verbliebenen Aktivität (siehe 2.5.5.) ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche: die Wirkung von DBcAMP auf die Glucosebildung in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber

3.1.1. Stimulierung der Glycogenolyse

Zur Prüfung einer dem physiologischen Nucleotid analogen Wirkungsweise von DBcAMP unter unseren Versuchsbedingungen wurde zunächst die Leber eines gefütterten Tieres ohne Substrat perfundiert. Abb. 3 zeigt die Produktionsraten von Glucose, Lactat und Pyruvat sowie die Sauerstoffaufnahme der Leber.

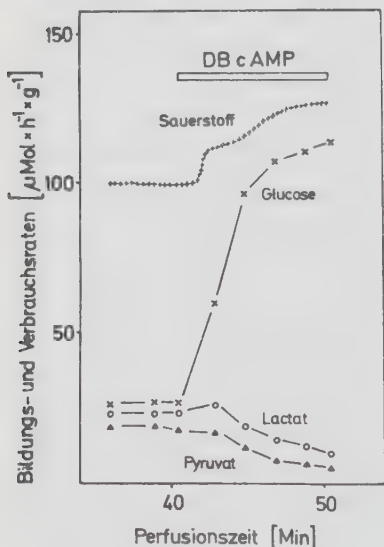


Abb. 3. DBcAMP-Effekt auf die G l y c o g e n o l y s e der Leber einer gefütterten Ratte.

Körpergewicht 253 g, Perfusionsrate 32 ml/Min. Nach 30minütiger Vorperfusion im rezirkulierenden System wurde mit frischem, substratfreiem Medium im offenen, nicht rezirkulierenden System weiterperfundiert. Bei 40,5 Min. Zugabe von 80 μM DBcAMP (angedeutet durch einen horizontalen Balken).

Die Produktionsraten von Glucose, Lactat und Pyruvat sowie die Sauerstoffaufnahme (in $\mu\text{Mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}$ Leber feucht⁻¹) sind gegen die Perfusionszeit aufgetragen.

Die Glucoseausschüttung stieg unter DBcAMP auf das 4-fache an, während Lactat- und Pyruvatbildung zurückgingen. Die Ketogenese (nicht gezeigt) war unter diesen Bedingungen sehr niedrig, DBcAMP brachte keine Änderung.

An der kontinuierlich registrierenden Sauerstoffelektrode war frühestens etwa 1 Min. nach Zugabe des Nucleotids ein Effekt zu erkennen. Dies entspricht etwa der Zeit, die zur Äquilibration des prähepatischen Perfusions- und intrahepatischen Gefäßsystems benötigt wird. Eine metabolische Antwort erfolgt also ohne wesentliche Verzögerung.

Entsprechend der diätetischen Situation des Versuchstieres kann die gesteigerte Glucosebildung in Abwesenheit eines exogenen Substrates am ehesten mit einer Stimulierung der Glycogenolyse durch DBcAMP erklärt werden. Die gleichzeitige Atmungszunahme verbunden mit einem Rückgang der Lactat- und Pyruvatbildung läßt an eine zusätzliche Stimulierung der Gluconeogenese aus endogenem Substrat denken. Um für die folgenden Experimente mit Lebern gehungerter Tiere eine nennenswerte Rest-Glycogenolyse auszuschließen, die bei Verwendung radioaktiv markierter Substrate zu einer Aktivitätsverdünnung von Metaboliten und Produkten führen würde, wurde das in Abb. 4 gezeigte Experiment durchgeführt.

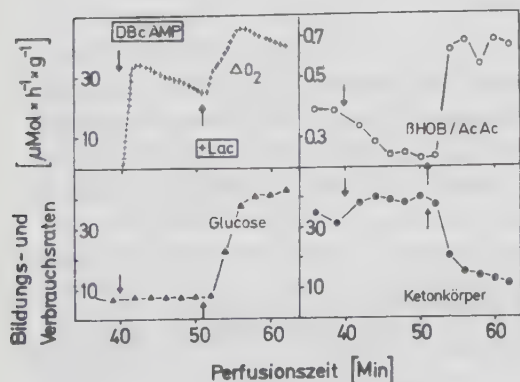


Abb. 4. DBcAMP-Effekte in der Leber einer 48 h gehungerten Ratte.

Gewicht 187 g, Perfusionsrate 27 ml/Min. Vorperfusion siehe Legende zu Abb. 3. Bei 40 Min. Zugabe von 80 μ M DBcAMP, bei 50 Min. zusätzlich 4,2 mM L-Lactat (siehe senkrechte Pfeile). Produktionsraten und Änderung der Sauerstoffaufnahme (O_2 -Verbrauch vor Substratgabe 108 μ Mol $\times$ h $^{-1}$ $\times$ g $^{-1}$), sowie, im semilogarithmischen Maßstab, der Quotient von BHOB- und AcAc-Konzentrationen im venösen Medium, sind gegen die Zeit aufgetragen.

Die Glycogenreserven sind nach 48stündiger Hungerperiode erschöpft, auf DBcAMP erfolgt keine weitere Glucoseausschüttung. Die noch verbliebene geringfügige Restproduktion muß aus Quellen erfolgen, die nicht sensitiv für das Nucleotid sind. Erst durch zusätzliche Infusion von Lactat als Substrat der Gluconeogenese kommt es zu einer starken Glucoseausschüttung.

Die unter Hungerbedingung sehr hohe Ketogenese konnte mit DBcAMP nur unwesentlich gesteigert werden. Sie ging auf Substratgabe, bei gleichzeitigem Anstieg des β -Hydroxybutyrat: Acetoacetat-Quotienten (β HOB/AcAc), deutlich zurück. Die Bildung von Lactat und Pyruvat war unter diesen Bedingungen sehr gering (in der Abbildung nicht gezeigt), die Zugabe von DBcAMP führte hier zu keiner meßbaren Änderung. Der auf DBcAMP-Gabe einsetzenden Mehratmung bis maximal $34 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ entsprach, abgesehen von der geringen Änderung der Ketonkörperbildung, keine faßbare metabolische Änderung. Im "steady state" nach Substratgabe zeigten dagegen Atmungssteigerung und Glucosebildung eine gute Korrelation. Diese Beobachtung konnte in 2 weiteren Experimenten wiederholt werden, in denen DBcAMP in Abwesenheit eines glucogenen Substrates infundiert wurde.

3.1.2. Stimulierung der Gluconeogenese aus L-Lactat, "Normalexperiment"

Um die Stimulierbarkeit der Gluconeogenese durch DBcAMP zu zeigen, wurde die Leber eines 48 Stunden gehungerten Tieres mit Lactat vorperfundiert (Abb. 5), Die auf Substratgabe anlaufende Gluconeogenese erreichte nach wenigen Minuten ein "steady state", ebenso die Pyruvatbildung, Ketogenese und Sauerstoffaufnahme.

Durch zusätzliche Infusion von DBcAMP wurde eine weitere Zunahme der Glucoseausschüttung erreicht, die von einer Atmungssteigerung begleitet war. Von den im vorhergehenden Abschnitt gezeigten Experimenten ausgehend können wir diesen Befund mit einer Stimulierung der Gluconeogenese durch DBcAMP erklären.

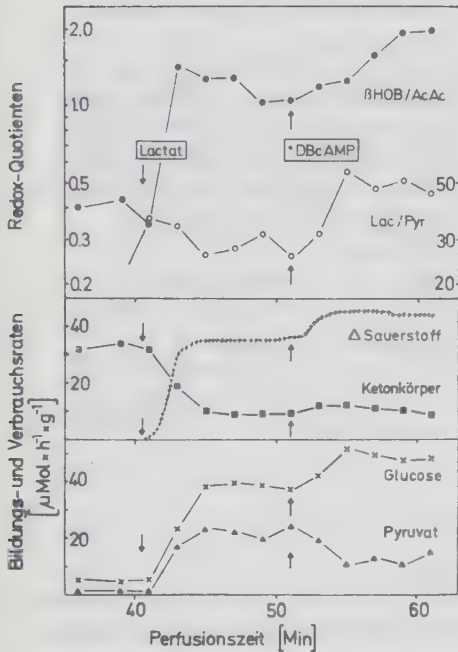


Abb. 5. Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat durch DBcAMP, "Normalexperiment"

Ratte 48 h gehungert, Gewicht 218 g, Perfusionsrate 26 ml/Min. Vorperfusion siehe Legende zu Abb. 3.. Bei 40,5 Min. Zugabe von 4,8 mM 2-³H-2-¹⁴C-L-Lactat, bei 51 Min. zusätzlich 80 μM DBcAMP (jeweils durch einen senkrechten Pfeil angedeutet). Im oberen Teil der Abbildung sind die Redox-Paare BHOB:AcAc (Ordinate links) und Lactat:Pyruvat (Ordinate rechts) im semilogarithmischen Maßstab, in den beiden unteren Teilen die Produktionsraten und die Änderung der Sauerstoffaufnahme gegen die Perfusionszeit aufgetragen. O_2 -Aufnahme vor Substratgabe $104 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}$ feucht.

Detaillierte Angaben zum Markierungsmuster einiger Metabolite sowie der neugebildeten Glucose siehe Abschnitt 3.2.2.3.

Die auf Lactatgabe einsetzende Pyruvatausschüttung ging unter DBcAMP wieder zurück, gleichzeitig stieg der Lactat:Pyruvat-Quotient im venösen Perfusat an. Die Ketonkörper-Produktion blieb unter cAMP nahezu unverändert, die bereits während der Lactatinfusion deutliche Negativierung des BHOB:AcAc-Potentials wurde noch verstärkt.

Für eine maximale Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat wurde eine DBcAMP-Konzentration von 80 μM tritriert (Abb. 6.).

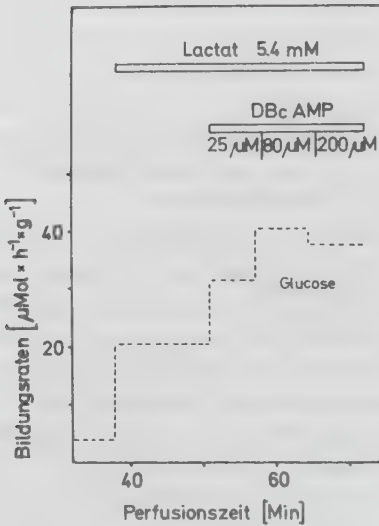


Abb. 6. Titration der zur Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat wirksamsten DBcAMP-Konzentration.

Ratte 48 h gehungert, Körpergewicht 275 g, Perfusionsrate 39 ml/Min. Vorperfusion siehe Legende zu Abb. 3. Bei 38 Min. Zugabe von 5,4 mM L-Lactat, ab 51 Min. zusätzlich DBcAMP in aufsteigenden Konzentrationen (siehe waagrechte Balken)

Für jede Behandlungsstufe sind die Glucosebildungsrate von 3 venösen Mediumproben, die während der letzten 4 Perfusionsminuten entnommen wurden, gemittelt und gegen die Perfusionszeit aufgetragen.

Dem in Abbildung 5 dargestellten Versuchsverlauf entsprechen alle folgenden Experimente ("Normalexperiment"). Die Ergebnisse von 8 Perfusionen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Produktions- und Verbrauchsrate sind auf das Körpergewicht bezogen, der Umrechnungsfaktor g Leber : 100 g Körpergewicht betrug innerhalb der Gewichtsgrenzen unserer Versuchstiere 4,2 ($n=23$, $p < 1\%$). Die in der Tabelle angegebenen p-Werte wurden mit Hilfe des t-Testes für Paardifferenzen bestimmt (58).

Tabelle 2

Produktions (+)- und Verbrauchs-
raten (-) einiger Metabolite der Gluconeogenese aus
L-Lactat (4,2 - 6,4 mM) und DBcAMP (80 μ M). Ratten (n=8)
48 h gehungert, Körpergewicht 161 - 275 g, Perfusionsra-
ten 20 - 39 ml/Min. Versuchverlauf siehe Abb. 5.
Zur Berechnung wurden jeweils die am Ende einer Behand-
lungsperiode ermittelten Werte (in μ Mol $\times$ h $^{-1}$ $\times$ 100 g
Körpergewicht $^{-1}$) verwendet. Es werden die Mittelwerte $\pm$
S.E.M. mit p-Wert angegeben (n.s. bedeutet "nicht signi-
fikanter"). A = ohne Substrat, B = mit Lactat, C = mit
Lactat + DBcAMP.

		A	B	C
Glucose	(+) (n=8)	27,5 $\pm$ 5,3	120 $\pm$ 9,4 (p<0,1%)	191 $\pm$ 14 (p<1%)
Sauerstoff	(-) (n=8)	633 $\pm$ 40	743 $\pm$ 32 (p<0,1%)	794 $\pm$ 40 (p<2%)
Pyruvat	(+) (n=8)	-	143 $\pm$ 22	104 $\pm$ 18 (p<2%)
Lactat	(-) (n=6)	-	527 $\pm$ 59	550 $\pm$ 46 (n.s.)
AcAc	(+) (n=5)	87,4 $\pm$ 13	10,8 $\pm$ 3,1 (p<1%)	14,3 $\pm$ 1,9(n.s.)
SHOB	(+) (n=3)	33,9 $\pm$ 9,6	19 $\pm$ 8,6 (p<10%)	20,8 $\pm$ 5 (n.s.)

Die durchschnittliche Stimulierungsrate der Gluconeogenese
mit DBcAMP betrug 59 %. Der vermehrten Glucosebildung ent-
sprach ein Sauerstoff-Mehrverbrauch, der mit Lactat allein
die Glucoseausschüttung um 19 % überstieg (Δ O $_2$ = 110,
 Δ Glucose = 93), in Gegenwart von DBcAMP dagegen um 28 %
hinter ihr zurückblieb (Δ O $_2$ $\pm$ 51, Δ Glucose = 71, Raten je-
weils in μ Mol $\times$ h $^{-1}$ $\times$ 100 g KG $^{-1}$). Gegenüber den Ausspül-
werten (vor Substratgabe) ergab sich allerdings eine gute
Stöchiometrie zwischen gesamter Mehratmung und Gluconeoge-
nese (Δ O $_2$ = 161, Δ Glucose = 163), entsprechend einem Ver-
brauch von 6 Mol ATP pro Mol neu gebildeter Glucose bei ei-
nem theoretischen P:O-Quotienten von 3.

Die unter Lactatinfusion ganz beträchtliche Pyruvatausschüttung wurde durch DBcAMP um 27 % vermindert.

Nach Auffüllung der zellulären Metabolitpools ist im "steady state" zu erwarten, daß die Verbrauchsrate des Substrates (Lactat) gleich den Bildungsrate der Produkte (Glucose, Pyruvat) sind. Die Tabelle zeigt, daß nur 73 % des metabolisierten Lactats vor, 89 % nach cAMP-Gabe in den genannten Produkten erschienen, mit p-Werten $< 10\%$ bzw. $< 20\%$ liegen diese Bilanzlücken allerdings im Streubereich. Limitierend für den Aussagewert dieser Bilanz ist die Genauigkeit der Lactatbestimmung, die unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr problematisch ist. Bei einer mittleren Lactat-Perfusionsrate von etwa $5000 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g}^{-1}$ liegt die Utilisierungsrate bei 10 %, ein für die Messung bereits kritischer Wert (siehe auch Abschnitt 3.2.1.).

Hingewiesen sei noch auf die geringfügige Stimulierung der Ketogenese unter DBcAMP bei gleichzeitiger Abnahme des βHOB : AcAc-Quotienten, im Gegensatz zu dem in Abb. 5 gezeigten Anstieg. Wegen der niedrigeren Zahl der βHOB -Messungen ist aber auch hier die Aussagekraft limitiert.

Nach WILLIAMSON et al. lassen sich aus den metabolischen Raten die Turnoverraten des Citratzyklus berechnen (33). Tabelle 3 zeigt die Kalkulation für die beschriebenen 8 Experimente. Der ATP-Verbrauch zur Fettsäureaktivierung in der Ketogenese sowie zur Bildung von Harnstoff kann jeweils vernachlässigt werden (die in Tabelle 2 nicht gezeigte Harnstoffbildung war an der Grenze der Nachweisbarkeit, DBcAMP hatte keine nennenswerte Wirkung).

Tabelle 3

Kalkulation des Citratzyklus - Turnover aus der Sauerstoffaufnahme und den Produktionsraten einiger Metabolite der in Tabelle 2 zusammengefaßten Lactatexperimente.

Cyanid-sensitive Atmung gleich 87 % der Gesamtatmung vor Substratgabe. Es wird angenommen, daß sie während des gesamten Versuches konstant bleibt.

Der zur Oxidation des bei der Bildung von Acetoacetat bzw. β -Hydroxybutyrat freiwerdenden Wasserstoffs verbrauchte Sauerstoff gleich 1,75 bzw. 1,25 $\mu\text{Mol pro } \mu\text{Mol AcAc bzw. } \beta\text{-HOB}$ (durchschnittliche Kettenlänge der Fettsäuren 16 C-Atome). Zur Verbrennung des bei der Bildung von Pyruvat aus Lactat freigesetzten Wasserstoffs verbrauchter Sauerstoff gleich 0,5 $\mu\text{Mol pro } \mu\text{Mol Pyruvat}$.

Alle Angaben in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g Körpergewicht}^{-1}$.

A = ohne Substrat, B = mit Lactat, C = mit Lactat + DBcAMP

	A	B	C
Sauerstoffverbrauch (gesamt)	633	743	794
Cyanid-sensitive Atmung	550	660	711

O_2 -Verbrauch zur Oxidation von Wasserstoffäquivalenten, freigesetzt bei der Bildung von

Acetoacetat	153	19	25
β -Hydroxybutyrat	42	24	26
Pyruvat	-	71	52
gesamt	195	114	103

O_2 -Verbrauch zur Oxidation von Wasserstoffäquivalenten, die bei der Bildung des im Citratzyklus verbrannten Acetyl-CoA sowie im Citratzyklus selber freigesetzt werden.

	355	546	608
--	-----	-----	-----

entsprechender Citratzyklus-Turnover (gleich $\text{O}_2 \times 2 : 5,75$)

	124	190	211
--	-----	-----	-----

Aus der Kalkulation kann auf eine geringe Aktivierung des Citratzyklus in Gegenwart von cAMP geschlossen werden, einem Mehrbedarf an Stoffwechselenergie bei gesteigerter Syntheseleistung durchaus entsprechend.

In Anbetracht der stark vereinfachenden Betrachtungsweise, die nur 3 Stoffwechselprodukte berücksichtigt, findet man eine erstaunlich gute Übereinstimmung zwischen dem kalkulierten O_2 -Mehrbedarf bei erhöhtem Citratzyklus und der gemessenen Mehratmung (132 gegenüber 110 und 174 gegenüber 161 vor bzw. nach Gabe von DBcAMP, jeweils in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g KG}^{-1}$). Man kann also annehmen, daß im Falle der Gluconeogenese ein Mehrbedarf an Stoffwechselenergie im wesentlichen durch den Citratzyklus gedeckt wird.

3.1.3. Die Wirkung von DBcAMP auf die Gluconeogenese aus Pyruvat

Entsprechend den im vorhergehenden Abschnitt geschilderten Lactatversuchen wurde der Einfluß von DBcAMP auf die Gluconeogenese aus Pyruvat untersucht. Die Lebern von 48 h gehungerten Ratten antworteten auf Substratgabe wieder mit einer starken Glucoseausschüttung, in diesem Falle konnte aber mit DBcAMP keine weitere Stimulierung erreicht werden (Abb. 7).

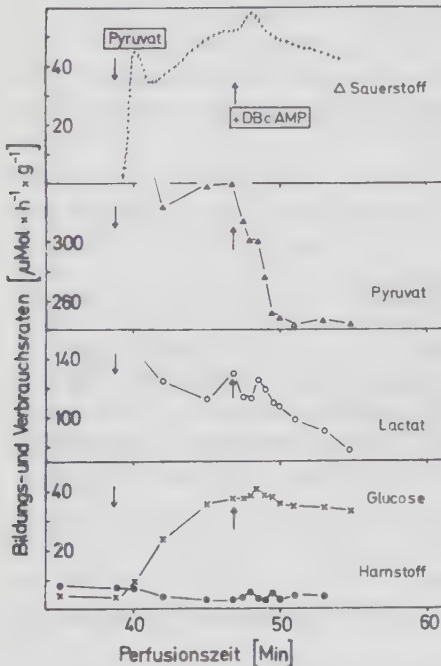


Abb. 7. Der Effekt von DBcAMP auf die Gluconeogenese aus Pyruvat.

Ratte 48 h gehungert, Körpergewicht 186 g, Perfusionsrate 31 ml/Min.. Vorperfusion siehe Legende zu Abb. 3. Bei 39 Min. Infusion von 5,2 mM Pyruvat, bei 47 Min. zusätzlich 80 μM DBcAMP (jeweils durch einen senkrechten Pfeil angedeutet). Es sind die Bildungsrate von Glucose, Lactat und Harnstoff, die Verbrauchsrate von Pyruvat und die Änderung der Sauerstoffaufnahme gegenüber der substratfreien Vorperfusion gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu beachten, daß die Ordinaten für Lactat und Pyruvat nicht im Nullpunkt beginnen. O_2 -Aufnahme vor Substratgabe $152 \frac{\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1}}{\text{g}}$ feucht.

Zwar folgte auf Nucleotidgabe ein in allen Versuchen zu beobachtender kurzzeitiger Anstieg der Glucoseproduktion, dessen Kinetik in dem abgebildeten Experiment durch rasch hintereinander abgenommene Proben deutlich wird. Nach Erreichen eines neuen Gleichgewichtes lagen aber die Gluco-

neogeneseraten auf dem gleichen Niveau wie vor DBcAMP. Der Verlauf der Sauerstoffaufnahme ist typisch für alle Pyruvatversuche: auf Substratgabe ein sehr rascher Anstieg, der der Glucosebildung vorausseilt, dann eine vorübergehende Hemmung und schließlich bis zum Gleichgewicht ein weiterer, verzögerter Anstieg. Ein komplexer Aktivierungs- und Hemmvorgang an der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase könnte am Zustandekommen dieser Atmungskinetik beteiligt sein. Auf DBcAMP erfolgte dann wieder, ganz analog der Glucoseausschüttung, ein kurzer Anstieg mit nachfolgender Abnahme. Pyruvataufnahme und Lactatbildung zeigten eine deutlich abfallende Tendenz auf cAMP-Gabe. Tabelle 5 faßt die Ergebnisse von 7 identisch verlaufenden Experimenten zusammen.

Tabelle 5

Produktions (+)- und Verbrauchs-
raten (-) einiger Metabolite der Gluconeogenese aus
Pyruvat (4,8 - 5,8 mM) ohne und mit DBcAMP (80 μ M). Ratten
(n=7) 48 h gehungert, Körpergewicht 120 - 232 g, Perfusions-
raten 18 - 31 ml/Min. Versuchsablauf siehe Abb. 7.
Zur Berechnung wurden jeweils die am Ende einer Behandlungs-
periode bestimmten Werte (in μ Mol $\times$ h⁻¹ $\times$ 100 g Körperge-
wicht⁻¹) verwendet. Tabelliert sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M.
mit p-Wert.

A = ohne Substrat, B = mit Pyruvat, C = mit Pyruvat + DBcAMP.

		A	B	C	
Glucose	(+)	18,4 $\pm$ 2,3	84,9 $\pm$ 11,2 (p<1%)	83,3 $\pm$ 8,1	n.s.
Lactat	(+)	-	264 $\pm$ 38	191 $\pm$ 24	(p<2%)
Sauerstoff	(-)	368 $\pm$ 42	487 $\pm$ 53 (p<0,1%)	459 $\pm$ 52	(p<5%)
Pyruvat	(-)	-	703 $\pm$ 112	570 $\pm$ 80	(p<5%)
Harnstoff	(+)	28,7	10,5	12,9	
(n=2)					

Unverändert blieb die mittlere Gluconeogeneserate von $85 \mu\text{Mol}$, die damit deutlich unter der mit Lactat als Substrat erreichten Rate von $120 \mu\text{Mol}$ lag. Auffallend ist aber, daß Glucoseausschüttung und Sauerstoffaufnahme in den Pyruvatversuchen bereits vor Substratgabe (Spalte A der Tabelle 5) geringer waren als in den Lactatversuchen (Tabelle 2), trotz - bis zum Augenblick der Substratgabe-identischer Bedingungen. Einschränkend ist zu sagen, daß nur bei der Sauerstoffaufnahme die Abweichung der Stichprobenmittel signifikant ist ($p < 0,1 \%$), dagegen bei der Glucoseproduktion innerhalb einer Zufallswahrscheinlichkeit von 10% liegt.

Die einzig faßbaren Abweichungen in beiden Versuchsgruppen sind beim Körpergewicht (Mittelwert der Pyruvatversuche 177 g , der Lactatversuche 208 g , $p > 10 \%$) und der Perfusionsgeschwindigkeit (Mittelwert der Pyruvatgruppe $22,9$, der Lactatgruppe $30,9 \text{ ml/Min.}$, $p < 2 \%$) zu finden. Nicht nur, daß für die Pyruvatexperimente kleinere Ratten verwendet wurden, ihre Lebern wurden zudem relativ niedriger perfundiert, wie der Quotient $\frac{\text{Perfusionsrate (ml/Min.)}}{100 \text{ g Körpergewicht}}$ gleich 13 gegenüber 15 in den Lactatversuchen deutlich macht. Die Beziehung zwischen relativer Perfusionsgeschwindigkeit und der Sauerstoffaufnahme ist in Abbildung 8 für eine große Zahl von Leberperfusionen dargestellt. Ohne eine genauere Aussage über den geometrischen Kurvenverlauf machen zu wollen, eine Korrelation der beiden Größen scheint vorzuliegen, was zu der Feststellung veranlaßt, daß die metabolische Aktivität der Leber wesentlich durch die Güte der Perfusion bestimmt wird.

Auf Grund dieser Darstellung ist zu diskutieren, ob die beiden Versuchsgruppen (mit Lactat bzw. Pyruvat als Substrat) überhaupt miteinander vergleichbar sind, ob nicht der nur beim Lactatexperiment nachgewiesene cAMP-Effekt auf die Gluconeogenese auf bessere Perfusionsbedingungen

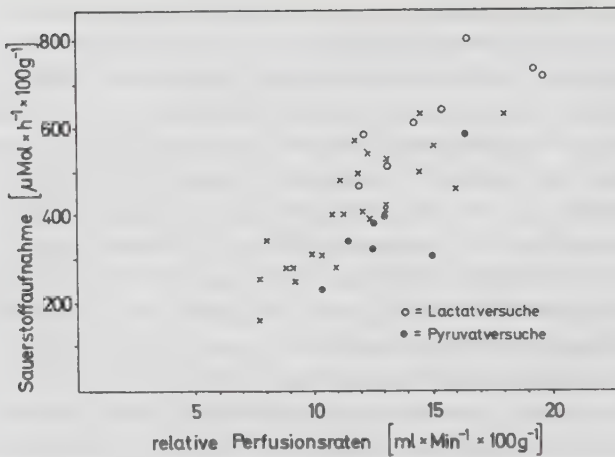


Abb. 8 Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme perfundierter Lebern von der relativen Perfusionsgeschwindigkeit.

Ratten (n=40) 48 h gehungert, Körpergewicht 120 - 306 g, Perfusionsraten 17,5 - 39 ml/Min. Nach 30 Minuten Perfusion im rezirkulierenden und 10 Min. im offenen System ohne Substrat wurde die Sauerstoffaufnahme durch die Leber gemessen.

Die Sauerstoffaufnahme ist gegen die relative Perfusionsrate aufgetragen.

zurückzuführen ist. Nach den vorliegenden Daten kann für die Glucoseausschüttung eine ähnliche Beziehung zur Perfusionsrate angenommen werden wie für die Sauerstoffaufnahme. Dagegen scheint die relative wie absolute Stimulierbarkeit durch das Nucleotid davon unabhängig zu sein. Z.B. erfolgte in einem Pyruvatexperiment mit sehr guter Perfusionsrate und Atmung (Abb. 7) keine, dagegen in dem abgebildeten Lactatexperiment mit wesentlich geringerer Atmung (Abb. 5), eine recht deutliche Stimulierung der Gluconeogenese durch DBcAMP. In der Lactatgruppe zeigt die Stimulierungsrate eine große Schwankungsbreite, eine

Beziehung zur Sauerstoffaufnahme und Gluconeogenese vor cAMP-Gabe ist dabei nicht feststellbar.

Zurück zu Tabelle 5. Während die Gluconeogenese aus Pyruvat in Gegenwart von DBcAMP unverändert blieb, zeigten Pyruvat- und Sauerstoffverbrauch sowie Lactatbildung eine signifikante Abnahme. Der für den Extrazellulärraum kalkulierbare Lactat:Pyruvat-Quotient deutet auf eine weitere Positivierung des cytosolischen Redoxpotentials hin. Bilanziert man Lactat und Glucose als Produkte des Pyruvatstoffwechsels, kommt man zur Deckung von lediglich 62 % ($p < 1\%$) vor bzw. 63 % ($p < 2\%$) des metabolisierten Pyruvats nach DBcAMP-Gabe. Es muß daher eine erhebliche Oxidation über die Pyruvatdehydrogenase und Veratmung zu CO_2 im Citratzyklus angenommen werden, vorausgesetzt, es erfolgte keine nennenswerte Ketonkörper- oder Aminosäure-Bildung aus Pyruvat. Beides wurde in der vorliegenden Versuchsreihe nicht gemessen, erfahrungsgemäß geht aber die Ketogenese auf Pyruvatgabe deutlich zurück (30), in einem Einzelexperiment zeigte sie keine Änderung unter cAMP-Infusion.

Setzt man den nicht als Lactat und Glucose bestimmten Teil des metabolisierten Pyruvat als oberen Grenzwert der Pyruvatoxidation, 269 und 212 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g}^{-1}$ vor bzw. nach DBcAMP-Gabe, so ist die Frage von Interesse, ob solche Oxidationsraten mit der meßbaren spezifischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in Einklang zu bringen sind. Diese beträgt, gemessen bei 25 °C, etwa 470 mU pro g friergestoppter Leber, wobei das Enzym in Gegenwart von 5 mM Pyruvat unter unseren Versuchsbedingungen zu 50 % in aktivierter Form vorliegt (zitiert nach MÜLLHOFER et al., Ref. 30). Umgerechnet auf einen Umsatz $\times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g} \text{ KG}^{-1}$ erhält man einen Wert von etwa 60 μMol . Bei einer 3-4-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität entsprechend einer höheren Perfusionstemperatur (33 °C) liegt man im Bereich der kalkulierten Pyruvatoxidation.

Aus den für die Pyruvatoxidation angenommenen Raten läßt sich der hierfür erforderliche Sauerstoffverbrauch berechnen (Tabelle 6). Er liegt im Bereich der Cyanid-sensitiven Atmung, durch DBcAMP mögen in geringem Umfang zusätzliche Wasserstoff liefernde Reaktionen in Gang gesetzt werden. Allerdings zeigen die kalkulierten Werte eine erhebliche Streuung, sie sind vom gemessenen O_2 -Verbrauch nicht signifikant verschieden.

Problematisch ist der im Verhältnis zur Gluconeogenese (und im Vergleich zu den Lactatversuchen) unverhältnismäßig hohe Sauerstoff-Mehrverbrauch (siehe Tabelle 5). Er liegt vor DBcAMP-Gabe um 79 % ($p < 1$ %), danach um 40 % ($p < 10$ %) über dem für die Glucoseneubildung erforderlichen Bedarf (bei einem P:O-Quotienten von 3). Zu diskutieren wäre ein hoher Rückfluß von Phosphoenolpyruvat über die Pyruvatkinase zu Pyruvat in Form eines "Futile cycle" (siehe Einführung). EXTON et al. fanden in Perfusionsexperimenten mit 10 mM Pyruvat (offene Perfusion) 5mal höhere PEP-Spiegel als in vergleichbaren Lactatversuchen (15), MÜLLHOFER erreichte mit unserem Perfusions-system ähnlich hohe Werte (59). Eine De-Inhibition der Pyruvatkinase durch hohe PEP-Konzentrationen könnte unter diesen Bedingungen gesteigerte "Futile cycle"-Raten zur Folge haben (40).

Tabelle 6

Sauerstoffbedarf bei vollständiger Pyruvatoxidation zu CO_2 . Produktions- und Verbrauchsraten von Pyruvat, Lactat, Glucose und O_2 sind der Tabelle 5 entnommen. Bei vollständiger Oxidation werden 5 $\mu\text{Mol H}_2$ pro $\mu\text{Mol Pyruvat}$ gebildet, zur Bildung von Lactat und Glucose werden 1 μMol bzw. 2 $\mu\text{Mol H}_2$ pro μMol verbraucht. Werte in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g Körpergewicht}^{-1} \pm \text{S.E.M.}$
B = mit Pyruvat, C = mit Pyruvat und DBcAMP

	B	C
Pyruvat verbraucht (gesamt)	703	570
Pyruvat utilized als Lac + Gluc	434	358
Pyruvat oxidiert (maximal)	269	212
H_2 , gebildet bei vollständiger Oxidation zu CO_2	1345	1060
H_2 , verbraucht bei der Bildung von Lac + Gluc	434	358
Überschüssige H_2 , die in der Atmungskette oxidiert werden müssen	911	702
dazu erforderliche O_2	456 ± 140	351 ± 148
gemessener O_2 -Verbrauch gesamt	487 ± 53	459 ± 52
Cyanid-sensitive Atmung	439 ± 48	411 ± 49

3.2. Versuche mit 2-³H-2-¹⁴C-L-Lactat

Nachdem unter unseren Versuchsbedingungen eine Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat durch DBcAMP nachgewiesen werden konnte, wurde im folgenden versucht, durch Verwendung positionsspezifisch markierter Substrate und Markierungsanalyse einzelner Metabolite der Gluconeogenese cAMP-spezifische Effekte im Intermediärstoffwechsel zu differenzieren. Ziel dieser Untersuchungen war es, das Verständnis der wechselseitigen Beziehungen mehrerer Stoffwechselwege, die direkt oder nur mittelbar mit der Gluconeogenese verknüpft sind, zu erweitern. Eine ausführliche Diskussion der Möglichkeiten und Grenzen solcher Stoffwechseluntersuchungen mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate findet sich bei MÜLLHOFER (59).

Der Ablauf der folgenden Perfusionsexperimente ist identisch mit dem im Abschnitt 3.1.2. beschriebenen Normalexperiment, weitere Einzelheiten sind im methodischen Teil aufgeführt. Als Kontrollwerte dienten die von MÜLLHOFER et al. angegebenen Daten (42-44). Die direkte Vergleichbarkeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente mit den genannten Kontrollversuchen erscheint etwas problematisch. Während dort nach identischer Vorperfusion, zuerst 30 Min. substratfrei rezirkulierend, dann 10 Min. substratfrei offen, für weitere 10 Min. mit markiertem Lactat bis zum Frierstopp perfundiert worden war, betrug hier die Perfusionszeit mit Lactat 20 Min., die letzten 10 Min. davon zusätzlich mit DBcAMP. Dieser modifizierte Versuchsablauf, der also in der Dauer der Exposition zum Substrat und zur Radioaktivität liegt, erschien uns notwendig, um im Einzelexperiment direkt den Stimulierungseffekt von cAMP nachweisen und mit den Metabolitanalysen in Beziehung bringen zu können. Die Vergleichbarkeit beider Experimente halten wir allerdings durch die Tatsache gewährleistet, daß sich bereits nach dreiminütiger Perfusion mit markiertem Lactat ein Isotopen-steady state einstellt, in dem es während weiterer 7 Minuten zu

keiner nennenswerten Änderung im Markierungsmuster mehr kommt (43). Wie Abb. 5 zeigt, stellt sich während dieser Zeit auch ein Gleichgewicht der Metabolitbewegungen, gemessen an den Bildungs- und Verbrauchsraten, ein. Zur zusätzlichen Kontrolle wurden in diesen Versuchen die Glucose jeweils vor und nach DBcAMP-Gabe aus dem venösen Medium isoliert und bezüglich Radioaktivität und Markierungsmuster miteinander verglichen.

3.2.1. Perfusionsbedingungen, Produktions- und Verbrauchsraten, Aktivitätsbilanz

Einige Parameter von 2 Perfusionsexperimenten mit 5 mM 2-³H-2-¹⁴C-L-Lactat und 80 µM DBcAMP (Versuch I, II) sind in Tabelle 7 zusammengefaßt, daneben Experiment III als Kontrollversuch ohne cAMP (zitiert nach Ref. 42). Tabelle 8 zeigt die Produktions- und Verbrauchsraten einiger Metabolite in den 3 Versuchen, ihr zeitlicher Verlauf ist in Abb. 5 für das Exp. II dargestellt.

Tabelle 7

Versuchsbedingungen von 3 Experimenten mit 2-³H-2-¹⁴C-L-Lactat. Experiment I und II mit 80 µM DBcAMP, Experiment III (Kontrollversuch) ohne DBcAMP. Einzelheiten über den zeitlichen Verlauf siehe 2.1.3. Exp. I wurde ohne Dextran im Perfusionsmedium durchgeführt.

	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Körpergewicht (g)	161	218	305
Lebergewicht (g)			
trocken	2,02	2,47	3,0
feucht (trocken x 4)	8,08	9,88	12,0
Durchfluß (ml/Min.)	29	26	26
Perfusionsdauer (Min.)			
ohne Substrat	45	40,5	40
mit Lactat	11	10,5	10
mit Lactat + DBcAMP	10,5	12,5	-
arterielle Lactatkonzentration (mM)	5,0	4,83	6,12

Tabelle 8

Produktions (+)- und Verbrauchs-
raten (-) einiger Metabolite der Gluconeogenese,
bestimmt aus arterieller und venöser Konzentration, dem
Lebergewicht und der Perfusionsrate.
Werte in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g Leber frisch}^{-1}$, Mittelwerte aus
2-3 Einzelbestimmungen am Ende einer Versuchsphase.

A = ohne Substrat, B = mit Lactat, C = mit Lactat + DBcAMP.

		Exp. I			Exp. II			Exp. III	
		A	B	C	A	B	C	A	B
Sauerstoff	(-)	122	152	172	104	140	148	69	88
Lactat	(-)	-	25	53	+4	151	178	-	32
Glucose	(+)	13	38	48	6	39	49	5	18
Pyruvat	(+)	-	11	17	1	22	13	-	15
β HOB	(+)	7	8	4	10	7	7	1	1
Acetoacetat	(+)	23	2	2	24	4	4	23	8
Harnstoff	(+)	16	15	10	-	-	-		

Die Zunahme der Glucoseausschüttung auf cAMP-Gabe betrug in beiden Experimenten etwa 25 %, sie lag damit deutlich unter dem in Tab. 2 angegebenen Mittelwert von 60 % (n=8). Wie allerdings bereits aus dieser Tabelle hervorging sind die Schwankungen beträchtlich. Der Verlauf der Pyruvatausschüttung zeigte keine übereinstimmende Tendenz. Während sie im ersten Experiment mit DBcAMP noch zu steigern war, ging sie im zweiten deutlich zurück. β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat dagegen verhielten sich in beiden Versuchen nahezu identisch: Rückgang der Ketogenese nach Lactatgabe auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes, gleichzeitig starker Anstieg des β HOB/AcAc-Quotienten, keine weitere Änderung auf cAMP-Gabe. Bei der Harnstoffproduktion zeigte sich eine abnehmende Tendenz, sie lag allerdings in den

Experimenten II und III im Bereich der Meßempfindlichkeit und ist deshalb in der Tabelle nicht berücksichtigt. Der Sauerstoff-Mehrverbrauch nach Substratgabe und cAMP-Stimulierung läßt sich in allen 3 Versuchen gut mit der vermehrt gebildeten Glucose in Deckung bringen, die Werte für $\Delta \text{Glucose} / \Delta \text{O}_2$ liegen zwischen 0,68 und 0,98 entsprechend einem P:O-Quotienten von 2 bis 3. Keine Übereinstimmung besteht dagegen zwischen dem gemessenen Lactatverbrauch und den Glucose- und Pyruvatbildungsraten. Grund dafür ist die bei der gewählten Perfusionstechnik (offenes System, hohe Durchflußraten, niedrige Temperatur) auftretende Schwierigkeit exakter Konzentrationsbestimmungen. Während man sich bei niedrigen Produktionsraten und entsprechend niedrigen venösen Konzentrationen dem Auflösungsbereich des optischen Tests nähert, liegt man bei der Bestimmung kleiner Verbrauchsrate bei hoher arterieller Substratkonzentration und entsprechend kleinen arteriovenösen Differenzen im Bereich der Testgenauigkeit. Ein exakteres Bilanzieren ist möglich, wenn man den Lactatverbrauch statt aus der arteriovenösen Konzentrationsdifferenz aus der Detritierungsrate des metabolisierten 2-³H-Lactats im steady state kalkuliert. Sie kann ermittelt werden aus der Summe der Impulsflüsse in tritiierte Produkte des Lactatstoffwechsels, die im venösen Perfusat erscheinen - im wesentlichen Glucose und ³HOH, wie Tabelle 9 zeigt.

Die in der Tabelle als "inkorporiert" genannte Radioaktivität, die lediglich die arteriovenöse Aktivitätsdifferenz angibt, entfällt auf den Einbau von Markierung in zellständige Produkte des Lactatstoffwechsels wie Glycogen, Lipide und Proteine, sowie auf die Bildung von ³HOH bzw. ¹⁴CO₂, das über die Leberoberfläche abgedampft ist, und ¹⁴C-Bicarbonat, das beim Ansäuern der venösen Mediumproben als ¹⁴CO₂ ausgetrieben wurde. Die "nicht identifizierte" Radioaktivität ist, sofern überhaupt signifikant, Ketonkörpern, Glycerin und Aminosäuren zuzuordnen, die von der Leber aus-

geschieden werden und hier nicht bestimmt wurden. Nach Untersuchungen von EXTON et al. mit U-¹⁴C-Lactat (Perfusionsdauer 1 h, rezirkulierend) stellen sie nur einen sehr geringen Anteil am Lactatstoffwechsel dar (6). Im übrigen muß wieder für die "inkorporierte", als Impulsdifferenz gemessene, und die rechnerisch ermittelte "nicht identifizierte" Aktivität, deren Größe im wesentlichen von der venösen Lactataktivität, somit auch von der Lactatkonzentration abhängt, die oben getroffene Einschränkung gelten, daß sie als kleine Differenzen großer Meßzahlen erheblichen Schwankungen unterliegen. Dies trifft dagegen nicht für die markierten Produkte zu (³HOH, Glucose, Pyruvat), die jeweils isoliert bestimmt wurden, ³HOH im Lyophilisationswasser, die übrigen nach Isolierung und chromatographischer Reinigung.

Tabelle 9

Aktivitätsbilanz der Perfusionsexperimente I und II, errechnet aus den im arteriellen und venösen Perfusat gezählten Impulsen, dem ^3HOH -Gehalt im Lyophilisationswasser sowie der Konzentration und spezifischen Aktivität von Metaboliten im venösen Perfusat. Die spezifische Aktivität von Pyruvat wurde der des zellulären Lactats gleichgesetzt (siehe Tabelle 12), die spezifischen Aktivitäten von Lactat und Glucose wurden der Tabelle 11 entnommen. Die Werte sind auf die Radioaktivität des arteriellen Mediums bezogen (Angabe in %). B = mit Lactat, C = mit Lactat + DBcAMP.

arterielles Medium - Exp. I:									
$^3\text{H} = 2,38 \times 10^6 \text{ ipm/ml}$									
$^{14}\text{C} = 4,99 \times 10^5 \text{ ipm/ml}$									
Exp. II:									
$^3\text{H} = 1,59 \times 10^6 \text{ ipm/ml}$									
$^{14}\text{C} = 1,57 \times 10^5 \text{ ipm/ml}$									
		Exp. I				Exp. II			
		$^3\text{H}(\%)$		$^{14}\text{C}(\%)$		$^3\text{H}(\%)$		$^{14}\text{C}(\%)$	
		B	C	B	C	B	C	B	C
arteriell		100	100	100	100	100	100	100	100
venös		100	95	98	97	93	98	90	95
"inkorporiert"		-	5	2	3	7	2	10	5
^3HOH	venös	8,5	9,1	-	-	12,5	15,2	-	-
Glucose	"	0,9	1,4	2,9	4,6	2,3	3,4	7,9	9,9
Pyruvat	"	-	-	0,4	0,6	-	-	1,4	0,9
Lactat	"	89	87	97	92	74	76	76	78
identifiziert		98	98	100	97	89	95	85	89
"nicht identifiz."		2	-	-	-	4	3	5	6

Wenn man angenähert die Summe der Aktivitätsflüsse in tritierte Substanzen des venösen Perfusates mit der Detritierungs- bzw. Metabolisierungsrate des Lactats gleichsetzt, erhält man die in Tabelle 10 kalkulierten Lactat-Verbrauchsraten.

Inkorporierte und nicht identifizierte Radioaktivität sind dabei nicht berücksichtigt. Weiterhin sind in der Tabelle ^{14}C -Flußraten bilanziert, für die die gleiche Überlegung gelten kann. Die nicht direkt gemessenen $^{14}\text{CO}_2$ -Flüsse sind berechnet unter der Annahme, daß die aus Lactat neugebildete Glucose doppelte spezifische ^{14}C -Aktivität gegenüber Lactat haben müsse, sofern nicht durch Interaktion mit dem Citrat- oder Pentosephosphatzyklus (siehe nächster Abschnitt) Radioaktivität in Form von CO_2 verloren geht. Demnach kann aus einer Verminderung der Glucoseaktivität unter den theoretischen Wert die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung ermittelt werden. Voraussetzung ist allerdings, daß die Glucose nicht aus einem hochmarkierten Acetyl-CoA zusätzliche Aktivität inkorporiert. Dies ist unter unseren Versuchsbedingungen nicht der Fall (siehe unten).

Die Detritiierungsraten als Summe der Tritiumflüsse zeigen erhebliche Abweichungen von den gemessenen Lactatverbrauchsrate der Tabelle 8, stimmen aber mit den kalkulierten ^{14}C -Flüssen und den ebenfalls in Tabelle 10 aufgeführten Trioseflüssen (gleich der Summe der Bildungsraten von Pyruvat + Glucose $\times 2$) gut überein. Die Werte dürften den tatsächlichen Utilisierungsraten von Lactat angenähert entsprechen. Die durchweg höheren Tritiumflüsse deuten darauf hin, daß neben dem Nettofluß von Kohlenstoffkörpern in Produkte des Lactatstoffwechsels zusätzliche Austauschprozesse stattfinden, z.B. mit mitochondrialem, nicht markiertem Wasserstoff. Da die bilanzierten ^{14}C - und Trioseflüsse andererseits nur eine untere Grenze angeben, dürfte das Ausmaß solcher Austauschprozesse nur gering sein.

Tabelle 10

L a c t a t v e r b r a u c h s r a t e n , kalkuliert aus den in Tabelle 9 berechneten prozentualen venösen Tritium- und ^{14}C -Flüssen in markierte Produkte des Lactatstoffwechsels a) (in %) vom gesamten arteriellen Aktivitätsfluß b) (in ipm/ml), der spezifischen Aktivität des arteriellen Lactats c) (in ipm/ μMol , siehe Tabelle 12) und den relativen Perfusionsraten P) (in ml/h x g Leber, siehe Tabelle 7). Die Summe der kalkulierten Tritium- bzw. ^{14}C -Flüsse wird als Verbrauchsrate von Lactat angesehen.

$$\text{Flußrate bzw. Verbrauchsrate } (\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}) = \frac{a \times b \times P}{c \times 100}$$

B = mit Lactat, C = mit Lactat + DBcAMP

		Exp. I		Exp. II	
		B	C	B	C
^3HOH	Flußrate	92	98	95	116
$^3\text{H-Glucose}$	"	9,7	15,1	17,8	26
Summe Tritiumflüsse		102	113	113	142
$^{14}\text{C-Pyruvat}$	Flußrate	4,3	6,5	10,7	6,9
$^{14}\text{C-Glucose}$	"	31,3	49,6	60,3	75,6
$^{14}\text{CO}_2$	"	46	47,7	18	20,2
Summe $^{14}\text{C-Flüsse}$		82	104	89	103
Summe der Flüsse von Trioseeinheiten in Pyruvat und Glucose		87	113	100	112

3.2.2. ^3H - und ^{14}C -Markierungsmuster einiger Metabolite der Gluconeogenese

Zum besseren Verständnis der nun folgenden Analyse der Markierungsmuster einiger Metabolite und Produkte der Gluconeogenese seien einige theoretische Betrachtungen vorausgeschickt (siehe auch Ref. 44, 59).

3.2.2.1. Möglichkeiten der ^{14}C -Markierung

Aus den in Abb. 1 skizzierten Wechselbeziehungen zwischen der Gluconeogenese aus Lactat mit verschiedenen cytosolisch

oder mitochondrial ablaufenden Stoffwechselprozessen ergeben sich für die ^{14}C -Markierung folgende Konsequenzen:

- 1) Extrazellulär markiertes Lactat äquilibriert über die Plasmamembran mit dem cytosolischen Lactat-Pool. Nach Oxidation zu Pyruvat und Permeation in den mitochondrialen Matrixraum erfolgt Carboxylierung zu Oxalacetat (OAc). Bei Verwendung von 2- ^{14}C -L-Lactat als radioaktivem Tracer entsteht ein am C-2-Atom markiertes OAc, das über die mitochondrialen Isoenzyme der Malatdehydrogenase und Fumarase mit Malat und Fumarat äquilibriert. Da im Fumarat die mittleren C-Atome im Gegensatz zu Malat sterisch gleichwertig sind, erfolgt bei schneller Gleichgewichtseinstellung eine Randomisierung der ^{14}C -Aktivität über diese C-Positionen, die nun jeweils die halbe Radioaktivität des ursprünglich nur an C-2 markierten OAc tragen. Die Gesamtaktivität der 3 im Gleichgewicht stehenden Dicarbonsäuren bleibt dabei unverändert, während im Falle der Tritiummarkierung Malat und Fumarat die doppelte Ausgangsaktivität erreichen können (siehe 3.2.2.2.).
- 2) Mitochondriales Oxalacetat kann mit Acetyl-CoA in der Citratsynthetase-Reaktion zu Citrat kondensiert und im Citratzyklus metabolisiert werden. Dabei wird die ursprüngliche ^{14}C -Markierung in komplexer Weise verändert. Bedingt durch die Stereospezifität der Aconitase-Reaktion werden immer nur die aus dem OAc stammenden Carboxylgruppen zu CO_2 oxidiert. Die verbleibenden mittleren C-Atome bilden dagegen C-3 und C-4 des im Zyklus entstehenden Succinats, ihre Radioaktivität wird auf Grund der sterischen Symmetrie dieses Moleküls über alle 4 C-Atome randomisiert. Nach einem Umlauf im Citratzyklus erscheint somit die ursprünglich an C-2 gebundene Markierung in den Positionen 2 und 3 des Oxalacetats, die von C-3 dagegen in den Positionen 1 und 4, den Carboxylgruppen. Bei weiterem Zyklisieren von OAc geht durch Decarboxylierung die Aktivität der Carboxylgruppen wieder verloren,

pro Umlauf verliert das nun symmetrisch markierte OAc jeweils die Hälfte seiner Gesamtaktivität. Das Ausmaß dieser Inaktivierung hängt nun davon ab, wie schnell relativ zum ^{14}C -Verlust, d.h. zur Höhe des Citratzyklus-Turnover, ein neu aus Pyruvat entstandenes, hoch, aber wiederum nur an C-2 markiertes Oxalacetat mit dem Zyklus äquilibriert. Da im steady state der OAc-Pool konstant bleibt, hängt die Neubildung von hochmarkiertem OAc von der Geschwindigkeit der Gluconeogenese ab. Somit bestimmt das Verhältnis der Flußraten von Citratzyklus und Gluconeogenese den Aktivitätsgehalt und die Markierungsverteilung des Oxalacetats sowie aller ihm im Verlauf der Gluconeogenese nachfolgenden Metaboliten bis hin zur Glucose. Eine mathematische Formulierung dieser Beziehung wurde von MÜLLHOFER und KUNTZEN angegeben (30).

3) Das dem Citratzyklus als Substrat dienende Acetyl-CoA entstammt entweder der β -Oxidation endogener, nicht markierter Fettsäuren oder wird aus Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung gebildet. Bei Verwendung von 2- ^{14}C -Lactat als Precursor entsteht in letzterem Fall ein in der Carboxylgruppe markiertes Ac-CoA, das ebenfalls zur Markierung der Citratzyklusintermediate beiträgt. Seine Radioaktivität erscheint zunächst in der C-1-Stellung des Succinats, nach Randomisierung dann in den Carboxylgruppen des im Zyklus gebildeten Oxalacetats und schließlich in den Positionen 3 und 4 der Glucose.

4) Über Transaminierungsreaktionen stehen Pyruvat und Oxalacetat mit den Aminosäuren Alanin und Aspartat im Gleichgewicht. Über die Citratzyklus-Intermediate α -Ketoglutarat und Succinat werden Beziehungen zum Stoffwechsel weiterer Aminosäuren hergestellt. Bei hohem Proteinkatabolismus sind somit inaktive Zuflüsse in den radioaktiv markierten Pool der Ketosäuren bzw. Citratzyklus-Intermediate zu erwarten.

5) Das Kohlenstoffgerüst des mitochondrial markierten Oxalacetats permeiert über ein geeignetes Shuttlesystem die Mitochondrienmembran, wird im Cytosol zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert und in Umkehrung der Glycolyse zu Glucose umgesetzt. Aus dem in den Positionen 2 und 3 markierten OAc wird eine an den C-Atomen 1, 2, 5 und 6 identisch markierte Glucose gebildet.

Durch cytosolische Decarboxylierung von Malat über das "Malic enzyme" oder Rückreaktion von PEP über die Pyruvatkinase zu Pyruvat, Energie verbrauchende Reaktionen im Sinne eines "Futile cycle" (siehe Abb. 1), kann das ursprünglich nur am C-2-Atom markierte Pyruvat bzw. Lactat auch in 3-Stellung Radioaktivität inkorporieren (gleiches gilt auch für die Tritiummarkierung, siehe unten).

6) Auf der Höhe der Triosephosphate erfolgt über das α -Glycerophosphat eine Wechselwirkung zwischen Gluconeogenese und Fettstoffwechsel, auch hier also die Möglichkeit eines inaktiven Zuflusses.

7) Bei einer Wechselwirkung zwischen Gluconeogenese und Pentosephosphatzyklus sind sehr komplexe Veränderungen im Markierungsmuster der Hexosephosphate und damit auch der Glucose zu erwarten (59). Maßgeblich hierfür ist das Aktivitätsverhältnis der Positionen 1 bzw. 2 zur Position 3, die ja, wie oben beschrieben wurde, auf verschiedene Weise über Oxalacetat markiert werden. Sind erstere relativ höher markiert worden, kommt es durch Wechselwirkung mit dem Pentosephosphatzyklus zu einer Aktivitätsabnahme der oberen Trioseeinheit der Glucose gegenüber der unteren, die unverändert bleibt. Und umgekehrt zu einer Aktivitätszunahme, wenn C-3 relativ höher markiert war. Innerhalb der oberen Trioseeinheit kommt es zusätzlich noch zu ganz erheblichen Markierungsverschiebungen, deren Ausmaß durch das Verhältnis der Flußraten von Gluconeogenese und Pentosephosphatzyklus bestimmt wird.

8) Zu erwähnen sei schließlich noch die Möglichkeit eines inaktiven Zuflusses aus der Glycogenolyse in den Hexosephosphat-Pool.

3.2.2.2. Markierungsmöglichkeiten tritiiertter Positionen

1) Stereospezifisch am C-2-Atom des infundierten Lactats gebundenes Tritium wird in der durch die Lactatdehydrogenase (LDH) katalysierten Oxidationsreaktion auf das cytosolische NAD^+/NADH -System übertragen. Wie MÜLLHOFER et al. zeigen konnten, findet über weitere im Cytosol lokalisierte NADH-spezifische Dehydrogenasen wie Malatdehydrogenase (MDH), Glycerolphosphatdehydrogenase (GDH) und Glyceraldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) eine rasche Isotopenäquilibrierung zwischen den Dehydrogenasepositionen der entsprechenden Substrate und dem markierten NADH-Pool statt (43). Bei Gleichgewichtseinstellung zwischen Dehydrogenasen mit entgegengesetzter Stereospezifität für den am reduzierten Pyridinnukleotid gebundenen Wasserstoff (LDH, MDH = A-seitig, GDH, GAPDH = B-seitig) wird in entsprechender Weise NAD^+ markiert.

2) Malat, das durch Reduktion von Oxalacetat entsteht und dabei Tritium in C-2 inkorporiert, kann über die Fumarase-reaktion mit Fumarat äquilibrieren. Da im Fumarat die mittleren C-Atome wie bereits erwähnt sterisch gleichwertig sind, erscheint nach Hin- und Rückreaktion an der Fumarase die ursprünglich an C-2 gebundene Tritiumaktivität über die Positionen 2 und 3 im Malat verteilt. Bei rascher Äquilibrierung über die MDH mit dem markierten NADH-Pool und schneller Gleichgewichtseinstellung über die Fumarase gegenüber einer Neubildung und Metabolisierung kann Malat die doppelte NADH- bzw. NAD^+ -Aktivität erreichen, während Oxalacetat die einfache NADH-Aktivität in 3-Stellung inkorporiert.

3) Gelangt cytoplasmatisch markierter Wasserstoff über ein geeignetes Shuttlesystem in den mitochondrialen Matrixraum, wird durch Austauschreaktionen über entsprechende Dehydrogenasen auch der mitochondriale NADH-Pool markiert. In der bereits beschriebenen Weise werden Malat, Fumarat und Oxalacetat durch mitochondriale Isoenzyme der MDH und Fumarase tritiiert, über sie gelangt weiterhin Radioaktivität in den Tricarbonsäurezyklus.

4) Aus dem an C-3 markierten cytosolischen Oxalacetat gelangt über die PEPCK-Reaktion stereospezifisch Tritiumaktivität in die Methylengruppe von Phosphoenolpyruvat und , im weiteren Verlauf der Gluconeogenese, in die 3-Stellung der Phosphoglycerinsäuren, der Triosephosphate DAP und GAP und des α -Glycerophosphats. DAP und GAP werden darüberhinaus in der GAPDH-Reaktion am C-1-Atom mit dem markierten NADH-Pool äquilibriert.

5) In der durch die Aldolase katalysierten Kondensationsreaktion der Triosephosphate zu Fructose-1,6-di-P wird der in der GAPDH-Reaktion inkorporierte Wasserstoff an C-1 des DAP (das entspricht C-3 des FDP) stereospezifisch quantitativ wieder abgespalten, sodaß das entstehende FDP eine der Tritiumaktivität des NADH-Pools entsprechende Markierung nur noch an den C-Atomen 1, 4 und 6 behält. Das durch Hydrolyse von FDP entstehende F6P äquilibriert über die Phosphohexoseisomerase mit G6P, dabei wird sämtliche Tritiumaktivität aus der 1-Stellung mit Wasser ausgetauscht. Die durch Hydrolyse von G6P freigesetzte Glucose ist somit nur noch in 4- und 6-Stellung markiert.

6) α -Glycerophosphat, das über die GDH-Reaktion mit DAP im Gleichgewicht steht, erhält aus DAP Tritiumaktivität in 1- und 3-Stellung. Zusätzlich erfolgt über die GDH eine Äquilibrierung mit dem cytosolischen NADH-Pool, somit auch Markierung der 2-Stellung.

3.2.2.3. Markierungsverteilung, Kalkulation der zellulären Lactataktivität

Die Ergebnisse der Markierungsanalyse einiger Metabolite des Leberextraktes und der aus dem venösen Perfusat isolierten Glucose sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Den Werten zweier Perfusionen mit DBcAMP (Exp. I, II) sind die Daten eines Kontrollversuchs ohne zyklischem Nucleotid gegenübergestellt (Exp. III).

Tabelle 11

Markierungsmuster einiger Metabolite im Leberextrakt ("Gewebe") und Perfusionsmedium ("arteriell", "venös"). Die angegebenen Werte entsprechen den relativen spezifischen Aktivitäten, bezogen auf eine spezifische ^3H - und ^{14}C -Aktivität des infundierten Lactats von 1,0. Experiment I und II mit DBcAMP, zur Kontrolle Experiment III ohne DBcAMP, zitiert nach MÜLLHOFER et al. (42).

Spez. Aktivitäten des arteriellen Lactats:

Exp. I:	$^3\text{H} = 4,75 \times 10^5 \text{ ipm}/\mu\text{Mol}$	$^{14}\text{C} = 9,98 \times 10^4 \text{ ipm}/\mu\text{Mol}$
II:	3,30	" 3,26
III:	7,85	" 3,02

	Exp. I		Exp. II		Exp. III	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
Lactat arteriell	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Lactat venös Ø DBcAMP	0,91	0,99	0,92	0,95	0,84	0,93
Lactat venös + DBcAMP	0,91	0,97	0,99	1,03	-	-
Glucose venös Ø DBcAMP	0,25	0,81	0,44	1,54	0,45	1,33
C-Position 1 - 3	0,02	0,39	0,01	0,76	0,05	0,69
" 4	0,12	0,13	0,28	0,05	0,26	0,05
" 5	0,00	0,15	0,00	0,36	0,00	0,29
" 6	0,08	0,15	0,15	0,36	0,14	0,30
Glucose venös + DBcAMP	0,31	1,02	0,52	1,58	-	-
C-Position 1 - 3	0,02	0,51	0,02	0,79		
" 4	0,19	0,22	0,35	0,11		
" 5	0,00	0,14	0,00	0,34		
" 6	0,10	0,14	0,15	0,34		
Lactat Gewebe	0,63	0,68	0,85	0,88	0,81	0,83
Malat " gesamt	0,45	0,67	0,64	0,90	0,55	0,83
C-Position 2	0,22	-	0,31	-	0,27	-
" 3	0,23	-	0,30	-	0,25	-
" 4	-	0,21	-	-	-	-
Fumarat Gewebe gesamt	0,45	0,78	0,59	0,92	-	-
C-Position 2	0,24	-	-	-		
" 3	0,22	-	-	-		

Tabelle 11 (Fortsetzung)

	Exp. I		Exp. II		Exp. III	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
GP Gewebe gesamt	-	-	0,64	0,43	0,35	0,23
C-Position 1			0,07	-	0,05	-
" 2			0,57	-	0,30	-
NAD ⁺ Gewebe	-	-	0,38	-	0,26	-
Citrat Gewebe	0,17	0,74	0,18	0,89	0,20	0,91
Glutamat Gewebe	0,01	0,41	0,00	0,58	0,01	0,23
Aspartat "	0,47	0,60	0,18	0,57	0,09	0,13
OHOB "	0,33	0,11	-	-	-	-
PEP "	-	-	0,17	0,88	-	-

Zunächst fällt auf, daß im Versuch I die spezifischen Aktivitäten generell niedriger sind als in den beiden anderen Versuchen. Ursache könnten unterschiedliche Aktivitäten des zellulären Lactats als Ausgangssubstanz für die Markierung aller weiteren Metabolite sein.

Aus dem Gewebeextrakt isoliertes Lactat stellt eine Mischung aus extra- und intrazellulärem Lactat dar. Für die spezifische Aktivität von extrazellulärem Lactat kann angenähert der Mittelwert der Aktivitäten von arteriellem und venösem Lactat angenommen werden, das zelluläre Lactat läßt sich dann aus extrazellulärem- und Gewebelactat unter Berücksichtigung der Raumgrößen ermitteln. Dabei wird vorausgesetzt, daß extra- und intrazelluläre Konzentrationen gleich sind. Tabelle 12 zeigt die kalkulierten zellulären Lactataktivitäten für die 3 Versuche.

Zelluläres Lactat weist also jeweils gegenüber dem arteriellen Lactat eine stark erniedrigte Aktivität auf, die im ersten Versuch erwartungsgemäß am deutlichsten ist. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits früher mehrfach beschrieben, ohne

daß bisher eine befriedigende Erklärung für diese Aktivitätsverdünnung, die einen hohen Zufluß von inaktivem Lactat in den zellulären Pool voraussetzt, gegeben werden konnte. Die Abhängigkeit dieser Werte von der zellulären Lactatkonzentration würde sich übrigens in folgender Weise äußern: bei erniedrigter Konzentration (Gradient von außen nach innen) wäre die Aktivität des zellulären Lactats zu hoch kalkuliert und umgekehrt (Gradient nach außen) zu niedrig.

Tabelle 12

Relative spezifische ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten des zellulären Lactats, berechnet aus den Aktivitäten des extrazellulären- und Gewebelactats. Die Werte für den prozentualen Anteil von Extrazellulärraum (ECR) und Intrazellulärraum (ICR) am Gesamtwasser- und Gewebesraum wurden in Perfusionsexperimenten mit Carboxyl- ^{14}C -Inulin und Tritiumwasser unter sonst identischen Versuchsbedingungen bestimmt (E. Loy, unveröffentlicht). Sie betrugen bei Perfusionen mit Dextranhaltigem Medium im Mittel 75 % (ECR) und 25 % (ICR), ohne Dextran jeweils 50 %.

$$\text{rel.spez.Akt.ICR} = \frac{\text{rel.spez.Akt.Gew} \times 100 - \text{rel.spez.Akt.ECR} \times \text{ECR}}{\text{ICR}}$$

Versuch	$^3\text{H}_{\text{ven}}$	$^3\text{H}_{\text{ECR}}$	$^3\text{H}_{\text{Gew}}$	$^3\text{H}_{\text{ICR}}$	$^{14}\text{C}_{\text{ven}}$	$^{14}\text{C}_{\text{ECR}}$	$^{14}\text{C}_{\text{Gew}}$	$^{14}\text{C}_{\text{ICR}}$
I	0,91	0,95	0,63	0,31	0,97	0,98	0,68	0,38
II	0,99	1,0	0,85	0,42	1,03	1,01	0,88	0,50
III	0,84	0,92	0,81	0,49	0,93	0,96	0,83	0,44

3.2.2.4. ¹⁴C-Markierung der Glucose

Zunächst ist festzustellen, daß die Glucoseaktivität unter DBcAMP leicht ansteigt. Nennenswerte inaktive Zuflüsse aus der Glycogenolyse, der Lipolyse oder dem Proteinkatabolismus, Stoffwechselwege, die durch cyclisches AMP stimuliert werden können (siehe Einleitung), scheinen demnach unter unseren Versuchsbedingungen nicht in Erscheinung zu treten. Die identische Markierung der beiden Trioseeinheiten C1-3 und C4-6 läßt eine stärkere Wechselwirkung zwischen Pentosephosphatzyklus und Gluconeogenese ausschließen.

Differenziert man die einzelnen Kohlenstoffpositionen in der Glucose, so wird deutlich, daß die Aktivitätszunahme auf DBcAMP, die in Experiment I ausgeprägter ist, durch (nahezu) eine Verdoppelung der Markierung in 4-Stellung zustande kommt, Hinweis für einen Anstieg der Aktivität des mitochondrialen Acetyl-CoA (siehe unten). Experiment I zeigt im übrigen bereits vor cAMP-Gabe eine vergleichsweise untypische Markierungsverteilung in der Glucose, noch ausgeprägter aber danach. Sie entspricht weitgehend dem Aktivitätsmuster in Perfusionsexperimenten mit 2-¹⁴C-Pyruvat (30). Dies wird bestätigt, wenn man dazu die C-4-Carboxylgruppe des Malats vergleicht. Eine gegenüber den übrigen Lactatexperimenten gesteigerte Oxidation von Lactat, möglicherweise auf Grund einer eingeschränkten mitochondrialen β -Oxidation, könnte die Ursache sein für einen Aktivitätsanstieg des mitochondrialen Acetyl-CoA, aus dem ja die Carboxylgruppe des Malats markiert werden kann. Ähnlich starke Abweichungen der Aktivitäten eines Einzelexperimentes von einem typischen, mehrfach reproduzierten Muster konnte auch MÜLLHOFER in einem Versuch mit markiertem Pyruvat zeigen (59).

Die in allen Versuchen, ohne und mit DBcAMP, gemessene identische Markierung der Positionen 5 und 6 der Glucose stimmt gut mit der Tritiumäquilibrierung der 2- und 3-Stellung im Malat (und Fumarat, Experiment I) überein, Beweis für eine rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen den Dicarbonsäuren Oxalacetat, Malat und Fumarat.

3.2.2.5. ^{14}C -markierte Metabolite der Gluconeogenese

Fumarat, Malat, Citrat, Phosphoenolpyruvat. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der spezifischen Aktivitäten dieser Metabolite, es kann deshalb eine weitgehende Äquilibrierung cytosolischer und mitochondrialer Präkursoren der Gluconeogenese angenommen werden. Daß sich Citrat- und Malataktivität kaum unterscheiden, deutet darauf hin, daß die vom Acetyl-CoA stammenden C-Atome im Citrat nur gering, wenn überhaupt, markiert sind. Das in einem Versuch bestimmte β -Hydroxybutyrat, dessen Aktivität wahrscheinlich noch zu hoch angegeben ist (siehe 3.2.2.7.) - wegen zu geringer Substratmenge war eine saubere Isolierung nicht möglich -, läßt ebenfalls auf ein nur geringfügig markiertes Acetyl-CoA schließen. Es zeigt sich hier eine deutliche Diskrepanz zur Glucosemarkierung in C-4-Stellung (Versuch I), die ein höher markiertes AcCoA vermuten läßt. Ein entsprechender Befund wurde kürzlich von MÜLLHOFER et al. im Zusammenhang mit verschiedenen Mitochondrientypen diskutiert (30).

Malat stimmt jeweils gut mit der unteren Trioseeinheit der Glucose überein. Wenn man aus der C_4 -Position der Glucose auf die in der PEPCK-Reaktion verlorengegangene C_4 -Carboxylgruppe im Malat zurückschließt, erhält man theoretische Malataktivitäten von 0,72, 0,90 und 0,69 in den Versuchen I - III. Die gemessenen Malataktivitäten sind demgegenüber 0,67, 0,90 und 0,83, ein inaktiver Zufluß aus noch vorhandenem Glycogen mag die etwas verdünnte Triose in Versuch III erklären.

Glutamat, Aspartat. Die beiden Aminosäuren, die über Transaminierungsreaktionen mit Citratzyklus- und somit auch Gluconeogeneseintermediaten im Gleichgewicht stehen, weisen übereinstimmend in allen vergleichbaren Perfusionsexperimenten mit Lactat eine sehr niedrige, weit unter der des Malats und Citrats liegende Aktivität auf (siehe Experiment III). Demgegenüber steht eine deutliche Zunahme nach cAMP-Gabe. Die von UI et al. in jüngster Zeit veröffentlichten Untersuchungen zeigen ebenfalls einen deutlichen Aktivitätsanstieg in den Aminosäuren nach Glucagongabe. Die Autoren interpre-

tierten diesen Befund als Hinweis für einen durch das Hormon aktivierten Schritt zwischen Oxalacetat und Phosphoenolpyruvat, sei es die PEPCK-Reaktion selbst oder den Transfer von OAc aus den Mitochondrien (38, 35). Da Glucagon nach Untersuchungen von MALLETTE et al. den zellulären Aminosäurestoffwechsel steigert und darüberhinaus ihren Transport über biologische Membranen zu aktivieren scheint (16), läßt sich der beobachtete Anstieg in der Markierung auch mit einem beschleunigten Austausch zwischen Kompartimenten mit unterschiedlicher Radioaktivität erklären.

L-Glycerophosphat. Wie früher bereits mehrfach diskutiert (42, 44) weist LGP eine gegenüber der Trioseinheit der Glucose verminderte ^{14}C -Aktivität auf. Dies wurde als Hinweis für eine Kompartimentierung des Triosephosphatpools betrachtet. Nach DBcAMP-Gabe ist der Aktivitätsunterschied nicht mehr so deutlich, was auf einen beschleunigten Austausch zwischen verschiedenen Kompartimenten schließen läßt.

3.2.2.6. Kalkulation der zellulären Pyruvat- und Acetyl-CoA- ^{14}C -Aktivität

Nach dem von MÜLLHOFER et al. entwickelten Ansatz läßt sich aus der ^{14}C -Aktivität der 5- bzw. 6-Stellung der Glucose sowie den Gluconeogeneseraten der Turnover des Citratzyklus berechnen, aus der Aktivität der 4-Stellung und dem Citratzyklus andererseits die Aktivität des zellulären Acetyl-CoA ermitteln (59, 30). Hauptproblem hierbei ist die für die Kalkulation notwendige Kenntnis der Markierung des zellulären Pyruvats bzw. Lactats (siehe 3.2.2.3.). Geht man von den für den Zellulärraum kalkulierten ^{14}C -Aktivitäten aus, so erhält man für das Experiment I Citratzyklusraten von 41 und $69 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ vor bzw. nach Gabe von DBcAMP, für die beiden anderen Experimente dagegen negative Werte. Setzt man dagegen die venöse Lactataktivität als repräsentativ

für die des zellulären Pyruvats, werden Zyklusraten von 349 und 473 für Experiment I, von 50 und 101 für Experiment II, jeweils vor bzw. nach cAMP-Gabe, und von 43 für Experiment III bestimmt (Werte in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$). Ob nach dem einen oder anderen Verfahren ermittelt, solche Zyklusraten sind unrealistisch, denn sie entsprechen auch nicht angenähert den aus der Sauerstoffaufnahme kalkulierten Raten (siehe Tabelle 13). Somit müssen die der Berechnung zugrunde gelegten Pyruvat-Aktivitäten als falsch angesehen werden.

Ist es also nicht möglich, aus der Glucosemarkierung den Citratzyklus zu bestimmen, so läßt sich aber nach dem gleichen Verfahren mit den analog zu Tabelle 3 kalkulierten Turnoverraten des Citratzyklus die ^{14}C -Aktivität von zellulärem Pyruvat und Acetyl-CoA berechnen. Tabelle 13 zeigt die ermittelten Werte.

Tabelle 13

Berechnung der relativen spez. Pyruvat (P) - und Acetyl-CoA (A) - Aktivität aus der Gluconeogenese (G), den nach Tabelle 3 kalkulierten Turnover-Raten des Citratzyklus (Z) und den rel. spez. ^{14}C -Aktivitäten der 4- und 5-Stellung der Glucose (C_4 bzw. C_5). Die von MÜLLHOFFER et al. angegebenen Formeln (30) sind folgendermaßen abgewandelt:

$$P = C_5 \times \frac{2G \times Z}{G} \quad A = C_4 \times \frac{2}{X} - C_5 \quad X = \frac{Z}{G + Z}$$

X gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Oxalacetat den Citratzyklus passiert. Gluconeogenese- bzw. Citratzyklus-Raten in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g Leber}$
B = mit Lactat, C = mit Lactat + DBcAMP

	Exp. I		Exp. II		Exp. III
	B	C	B	C	B
Gluconeogenese (in Triosen)	75	97	77	98	36
Citratzyklus-Turnover	40	46	34	38	19
X	0,35	0,32	0,31	0,28	0,35
C_4 -Aktivität	0,13	0,22	0,05	0,11	0,05
C_5 -Aktivität	0,15	0,14	0,36	0,34	0,29
Pyruvat-Aktivität	0,38	0,35	0,83	0,81	0,73
Acetyl-CoA-Aktivität	0,60	1,23	0,60	0,45	0,00

Die Aktivität des zellulären,metabolisch aktiven Pyruvats liegt demnach in den Versuchen II und III weit über dem im Abschnitt 3.2.2.3. kalkulierten Wert, entspricht ihm dagegen in Versuch I. Abweichungen der Raumgrößen von den angegebenen Durchschnittswerten sowie Konzentrationsgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum können diese Unterschiede ausreichend erklären (siehe 3.2.2.3.). Festzustellen ist in allen 3 Experimenten eine Inaktivierung des zellulären Pyruvatpools unterschiedlichen Ausmaßes, am stärksten in Versuch I, für die wir bislang keine Erklärung finden (siehe auch Ref. 60). Daß dieses Pyruvat repräsentativ ist für den am Metabolismus beteiligten Pool, ergibt sich aus der guten Übereinstimmung mit der ^{14}C -Aktivität des aus dem Gewebe isolierten Malats (siehe Tab. 11). DBcAMP führt zu einer geringen Verminderung der Pyruvataktivität, möglicherweise durch weitere Stimulierung eines inaktiven Zuflusses aus endogenen Quellen wie dem Proteinkatabolismus.

Auffällig ist die Diskrepanz zwischen den kalkulierten Acetyl-CoA-Aktivitäten, in Versuch I wie schon oben vermutet hoch mit Verdoppelung unter cAMP, in Versuch II zuerst gleich Null, ~~gering~~ dann auf Nucleotidgabe, keine Aktivität auch in Versuch III. Markiertes Acetyl-CoA entsteht aus ^{14}C -Pyruvat auf dem Wege der oxidativen Decarboxylierung, unterschiedliche Aktivitätsgrade der Pyruvatdehydrogenase mögen die abweichenden Radioaktivitäten von AcCoA in den einzelnen Versuchen erklären. Die Stimulierung eines inaktiven Zuflusses aus der β -Oxidation endogener, nicht markierter Fettsäuren, der unter cAMP mehrfach beobachtet wurde (siehe Einleitung), kann unter unseren Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden, eher muß eine Aktivierung der Pyruvatoxidation durch das zyklische Nucleotid postuliert werden. Bezogen auf die Pyruvataktivität ist die des AcCoA im ersten Experiment theoretisch zu hoch - eine Beobachtung, die von MÜLLHOFER und KUNTZEN bereits einmal

an einem Pyruvatexperiment demonstriert wurde (60). Es sei noch kurz diskutiert, inwieweit falsch kalkulierte Citratzyklusraten die ermittelten Größen beeinflussen können. Aus den in der Legende zu der Tabelle 13 angegebenen Formeln geht hervor, daß die Pyruvataktivität mit kleiner werdendem Citratzyklus abnimmt, die Acetyl-CoA-Aktivität dagegen zunimmt. Aus der Tabelle 3 ist zu entnehmen, daß der Citratzyklus, abgesehen von der recht gut messbaren Sauerstoffaufnahme, von den Bildungsraten der Ketonkörper und des Pyruvats abhängt. Während letzteres wiederum exakt bestimmbar ist, ist die Messung der Ketonkörper-Konzentration im optischen Test problematisch. Bei relativ geringer Konzentration im venösen Perfusat, einer ziemlich langsam verlaufenden Testreaktion und dem in der Regel nur angenähert genau bestimmbaren Verlauf der Extinktionsänderung gegen die Zeit sollten die Ketonkörper eher zu hoch bestimmt sein - ein zu niedrig kalkulierter Citratzyklus wäre die Folge. Die von WILLIAMSON et al. vorgeschlagene Kalkulation geht davon aus, daß Ketonkörper ausschließlich aus Acetyl-CoA gebildet werden (33). Neuere Untersuchungen von SEUBERT et al. zeigen dagegen, daß ein beträchtlicher Anteil direkt aus Fettsäuren über Acetoacetyl-CoA entstehen kann (61). Danach wäre der in der Tabelle veranschlagte Sauerstoffverbrauch für den bei der Ketonkörperbildung anfallenden Wasserstoff zu niedrig angesetzt, der Citratzyklus also zu hoch berechnet. An diesem Beispiel werden die Grenzen indirekter Kalkulationen von Stoffwechselraten deutlich.

3.2.2.7. Tritiierte Metabolite der Gluconeogenese

NADH-abhängige Positionen von Malat, Fumarat, NAD^+ , Glucose.

Die direkt über NADH-abhängige Dehydrogenasen markierten Positionen von Malat (C-2-Position, markiert über die MDH-Reaktion) und Glucose (C-4-Position, markiert über die GAPDH-Reaktion) sowie NAD^+ weisen eine weitgehend identische Radioaktivität als Ausdruck einer ausreichenden Isotopen-

Äquilibrierung auf (siehe 3.2.2.2.). Eine rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen Malat und Fumarat über die Fumarase-Reaktion folgt aus der identischen Aktivität der mittleren C-Atome.

Lactat. Geht man von der im vorhergehenden Abschnitt kalkulierten ^{14}C -Aktivität des zellulären, metabolisch wirksamen Pyruvats aus (0,35 und 0,81 in den Versuchen I und II, jeweils nach cAMP-Gabe, 0,73 in Versuch III) und stellt sie den in Tabelle 12 kalkulierten Werten für das intrazelluläre ^{14}C -Lactat gegenüber, ist näherungsweise eine Korrektur der spezifischen Tritiumaktivität des zellulären, metabolisch wirksamen Lactats möglich. Man erhält hierfür Werte von 0,29 und 0,68 in den Versuchen I bzw. II und von 0,81 in Versuch III. Vergleicht man diese Tritiumaktivitäten, die man, eine nennenswerte Markierung der Methylgruppe des Lactats ausgeschlossen, als repräsentativ für die NADH-abhängige Wasserstoffposition im Lactat setzen kann, mit den anderen NADH-Positionen, so zeigt Versuch I nur eine geringe Aktivitätsverdünnung dieser Positionen gegenüber Lactat, die beiden anderen Versuche dagegen eine ganz erhebliche. Nach MÜLLHOFER läßt sich diese Verdünnung durch Äquilibrierung mit einem mitochondrialen, nicht markierten und im wesentlichen bei der β -Oxidation gebildeten NADH erklären (59). Im ersten Experiment könnte diese Äquilibrierung unvollständig oder die Bildung mitochondrialen NADH's eingeschränkt gewesen sein - für letztere Erklärung wurden oben bereits Argumente vorgetragen (siehe 3.2.2.4.).

L-Glycerophosphat. Im Unterschied zu dem Kontrollversuch ohne DBcAMP (Experiment III) weist die 2-Stellung des LGP (markiert über die GDH-Reaktion) in Versuch II eine deutliche Aktivitätszunahme gegenüber den übrigen Dehydrogenasepositionen und dem NAD^+ auf. In einem Perfusionsexperiment mit 5 mM 2- ^3H -D,L-Lactat und 100 μM DBcAMP bei sonst identischem Versuchsverlauf konnte dieser Befund bestätigt werden. Bezogen auf eine relative spezifische Tritiumaktivität der

2- bzw. 3-Stellung im Malat von 1,0 war hier die 2-Stellung im α -GP mit 1,9 ebenfalls deutlich erhöht (R. KRÄMER, P. WOLLENBERG und G. MÜLLHOFER, unveröffentlicht). Wie ist diese Aktivitätszunahme zu erklären?

In Wasserstoff-übertragenden Enzymreaktionen treten, sofern ein Teil der reagierenden Moleküle an Stelle des Wasserstoffs in enzymspezifischer Position ein Isotop, Deuterium oder Tritium, enthalten, sog. "Isotopeneffekte" auf. Ursache hierfür sind unterschiedliche Affinitäten zwischen Enzym und nicht markiertem bzw. markiertem Substrat, sie führen zu abweichenden Reaktionskonstanten und damit zu einer gewissen Diskriminierung oder "Aus-sortierung" der reagierenden Moleküle durch das Enzym. Wird z.B. in der Reaktion Wasserstoff bevorzugt gegenüber Tritium umgesetzt, häufen sich auf der Substratseite tritiumhaltige Moleküle an, die spezifische Tritiumaktivität des Substrates steigt.

Der Tritiumisotopeneffekt, ausgedrückt als Quotient der Geschwindigkeitskonstanten für den Umsatz von nicht-tritiiertem zu tritiiertem Substrat k_H/k_T , ist bei Reaktionen, die durch NAD-abhängige Dehydrogenasen katalysiert werden, erfahrungsgemäß klein und wird im Gleichgewicht von Hin- und Rückreaktion noch weiter verringert. Im Gegensatz dazu tritt er bei Reaktionen, die durch Flavin-haltige Oxidasen katalysiert werden, immer deutlich in Erscheinung (zur Übersicht siehe Ref. 62). Um nun auf die Aktivitätszunahme in der 2-Stellung von α -Glycerophosphat zurückzukommen, dieser Metabolit reagiert als Substrat nicht nur mit der NAD-spezifischen Glycerophosphatdehydrogenase (GDH), sondern auch mit einem Flavoenzym, der Glycerophosphatoxidase (GPOx). Reaktionsprodukt ist jeweils Dihydroxyacetonphosphat (DAP). Für die GDH-Reaktion wurde ein Tritiumisotopeneffekt von 1,4 bzw. 1,1 (Hin- bzw. Rückreaktion) bestimmt (63), für die GPOx-Reaktion dagegen ein Wert von 6,8 (64). Nimmt man an, daß eine Isotopenrückäquilibrierung über die GDH-

Reaktion im Gleichgewicht nur relativ langsam erfolgt, muß ein nennenswerter Substratumsatz durch die GPOx dank ihres hohen Isotopeneffektes zu einem Anstieg der Tritiumaktivität von GP in 2-Stellung führen. Dies ist tatsächlich der Fall nach Gabe von DBcAMP (siehe oben), man muß daher eine Zunahme des Flusses über das Flavoenzym annehmen. Eine ausführliche Diskussion dieses Befundes folgt im Abschnitt 4.2..

Aspartat, β -Hydroxybutyrat, Citrat, Phosphoenolpyruvat.

Die in Versuch I gemessenen Tritiumaktivitäten von Aspartat und β -Hydroxybutyrat (β HOB) sind mit Sicherheit zu hoch bestimmt. Aspartat entsteht durch Transaminierung aus Oxalacetat, das in 3-Stellung Markierung über Malat-Fumarat inkorporiert (siehe 3.2.2.2.). Es dürfte also maximal nur die halbe Malataktivität aufweisen - die gemessene theoretisch zu hohe Markierung kann nur mit einem unzureichenden Reinheitsgrad der isolierten Substanz erklärt werden. In Versuch II wurde daher Aspartat einer zusätzlichen Reinigung unterzogen (siehe 2.7.2.). Die daraufhin mit 0,18 bestimmte Tritiumaktivität fällt zwar etwas gegenüber den cytosolischen Dehydrogenasepositionen ab, da aber auch die ^{14}C -Aktivität etwa im gleichen Verhältnis bezogen auf Malat verringert ist, muß an eine Verdünnung aus einem inaktiven Kompartiment, z.B. dem Proteinabbau gedacht werden (siehe auch 3.2.2.5.). Ebenfalls gegenüber einem theoretischen Wert zu hoch markiert ist β HOB. Es inkorporiert Tritiumaktivität über den mitochondrialen NADH-Pool in 2-Stellung (Dehydrogenaseposition) und sollte, bei vollständiger Äquilibrierung des mitochondrialen mit dem cytosolischen NADH, maximal halbe Malataktivität aufweisen. Wegen zu geringer Substanzmenge war es leider nicht möglich, β HOB weiter zu reinigen. Das aus dem Gewebeextrakt gewonnene Malat und NAD^+ muß unter den Bedingungen der Gluconeogenese aus Lactat mengenmäßig fast ausschließlich dem Cytosol zugerechnet werden (65) und kann deshalb keine Auskunft über die Tritiumaktivität des mitochondrialen NADH-Pools geben. Abgesehen von β HOB (das hier wegen zu großer

Unsicherheit bezüglich seines Reinheitsgrades nicht verwertbar ist) sollte Citrat ein brauchbarer Indikator für die Aktivität des mitochondrialen Wasserstoffes sein. Es wird aus Oxalacetat gebildet, das über die mitochondrialen Isoenzyme der MDH und Fumarase Tritium in 3-Stellung inkorporiert. Citrat weist in allen 3 Experimenten eine gegenüber den cytosolischen Dehydrogenasepositionen verminderte Tritiumaktivität auf, Hinweis für eine inkomplette Äquilibrierung des mitochondrialen NADH-Pools mit dem Cytosol.

Schwierigkeiten bereitet die Deutung der Tritiummarkierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in Versuch II. PEP wird aus cytosolischem Oxalacetat gebildet, sollte also über Malat - Fumarat eine den cytosolischen Dehydrogenasepositionen entsprechende Radioaktivität in 3-Stellung inkorporieren. Die gemessene Tritiumaktivität ist demgegenüber viel zu gering, andererseits zeigt die ^{14}C -Aktivität eine gute Übereinstimmung mit dem fast ausschließlich dem Cytosol zuzuordnenden Malat. Für diese Diskrepanz haben wir im Augenblick keine Erklärung (siehe auch 3.2.2.8.).

3.2.2.8. Tritiummarkierung der Glucose, "Futile cycle 2"

Eine gesonderte Betrachtung verdient die Tritiummarkierung der Glucose. Wie auf Grund theoretischer Überlegungen zu erwarten war (Ref. 66, siehe auch 3.2.2.2.), sind im wesentlichen nur die Wasserstoffatome an den C-Positionen 4 und 6 der Glucose markiert. Es wurde bereits erwähnt, daß im Verlauf der Gluconeogenese aus 2- ^3H -Lactat Tritium in diese Positionen über Intermediate inkorporiert wird, die mehr oder weniger direkt mit dem cytosolischen markierten NADH-Pool äquilibrieren. Die schließlich in der 4-Stellung der Glucose bestimmte Aktivität entstammte dem durch die GAPDH katalysierten Reaktionsschritt, während Tritium in der 6-Stellung in einer früheren Reaktion, der Äquilibrierung von Oxalacetat, Malat und Fumarat durch die Enzyme MDH und Fumarase, inkorporiert wurde.

Die identische Tritiummarkierung der 2- und 3-Position des Malats, das wir als repräsentativ für das cytosolische Kompartiment annehmen dürfen (siehe oben), läßt auf eine weitgehende Äquilibrierung dieser Dicarbonsäuren, untereinander und mit dem cytosolischen NADH-Pool, schließen. Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang auf die ^{14}C -Markierungsverteilung in der Glucose (siehe 3.2.2.4.), die ebenfalls für eine Gleichgewichtseinstellung dieser Dicarbonsäuren sprach. Nun wäre zu erwarten, daß die Tritiummarkierung in der 6-Stellung der Glucose mit der in der 3-Stellung des Malats übereinstimmt. Dagegen wurde in allen 3 Versuchen nur etwa die Hälfte des von der Malataktivität her zu erwartenden Wertes bestimmt - ein Befund, der bereits früher mehrfach erhoben wurde, ohne daß er hinreichend erklärt werden konnte (66, 42). Die Tritiummarkierung in Position 4 der Glucose war identisch mit der anderer NADH-spezifischer Positionen (siehe 3.2.2.7.) und entsprach den theoretischen Erwartungen. Somit stellt sich die Frage, welche Reaktion im Verlauf der Gluconeogenese zu diesem verminderten Tritiumeinbau in die 6-Stellung der Glucose führt. Beginnen wir beim cytosolischen Oxalacetat (für das wir auf Grund der im Malat gemessenen Tritiumverteilung noch die volle, d.h. eine den NADH-Positionen entsprechende Tritiumaktivität in 3-Stellung annehmen dürfen), und der durch die PEPCK katalysierten Umwandlung zu Phosphoenolpyruvat. Tritiumverlust durch Austausch gegen Wasser ist hier möglich im Falle einer vorübergehenden Bildung der Enolform von Oxalacetat, sei es nichtenzymatisch (67) oder während der Bindung an das Enzym. Ältere Untersuchungen mit Hühnerleber-PEPCK hatten zwar keinen Hinweis für eine nennenswerte Beteiligung der Enolform von Oxalacetat am Reaktionsverlauf geben können. Die in vitro verfolgte Reaktion hatte nämlich, in Gegenwart von Deuteriumwasser, nicht zu einer Inkorporation von Deuterium in Oxalacetat oder PEP geführt (68). Da wir aber Speziesunterschiede im Reaktionsmechanismus nicht von vornherein ausschließen

konnten, untersuchten wir die PEPCK-Reaktion noch einmal mit dem gereinigten Rattenleber-Enzym ⁺). Wurde stereospezifisch in 3-Stellung mit Tritium markiertes PEP in Gegenwart von PEPCK zu Oxalacetat und weiter zu Malat umgesetzt, so konnte kein Tritiumaustausch ins Wasser beobachtet werden. Wurde die Reaktion umgekehrt mit nicht-markierten Substraten in Tritiumwasser ausgeführt, so kam es in beiden Reaktionsrichtungen zu keinem Tritiumeinbau in die Produkte (E.LOY und G.MÜLLHOFFER, unveröffentlicht). Wir schließen daraus, daß die PEPCK-Reaktion nicht zu einem Aktivitätsverlust führt, der sich im PEP (siehe Tabelle 11, Experiment II, und Abschnitt 3.2.2.7.) und schließlich in der 6-Stellung der Glucose manifestiert.

Zu diskutieren wäre weiterhin die Möglichkeit eines "Tritiumverlustes" aus der 6-Stellung der neugebildeten Glucose durch einen inaktiven Zufluß in den Triosephosphatpool mit Isotopenäquilibriumierung bis zum PEP. Auf Grund der niedrigen ¹⁴C-Aktivität des Glycerophosphats wurde früher bereits eine Kompartimentierung der Triosephosphate postuliert (42): ein aktiver gluconeogenetischer und ein inaktiver, möglicherweise aus endogener Lipolyse gespeister Pool, der allerdings über die GDH mit dem tritiierten cytosolischen NADH-Pool, aus dem Malat und C₄ der Glucose markiert werden soll, voll äquilibriert. Ein Zufluß inaktiver Triosephosphate würde die vom C-Atom 3 des Oxalacetats stammende Tritiumaktivität von C₆ der Glucose verdünnen, gleichzeitig aber auch die gesamte ¹⁴C-Aktivität von Glucose und PEP gegenüber Malat als Precursor. In den beschriebenen Experimenten stimmen allerdings die ¹⁴C-Aktivitäten von Malat, Glucose und PEP gut überein (siehe oben), weiterhin zeigen Versuche, in denen die Kompartimentierung der Triosephosphate, gemessen an der ¹⁴C-Aktivität von α GP, verringert oder aufgehoben zu sein scheint (Tabelle 11,

⁺) die Präparation wurde uns freundlicherweise von Dr. R.W.Hanson, Temple-University, Philadelphia USA, zur Verfügung gestellt.

Versuch II, und Ref. 44), eine unverändert niedrige Tritiumaktivität in der 6-Stellung der Glucose. Ein inaktiver Zufluß von Triosephosphaten als Ursache ist somit ausgeschlossen. Die einzig noch verbleibende Möglichkeit für einen Tritiumaustausch bzw. -verlust im weiteren Verlauf der Gluconeogenese impliziert das Vorhandensein eines "Futile cycle" zwischen Fructose-1,6-di-P und Fructose-6-P(FDP, F6P). Der Gedankengang ist folgender: ein im Verlauf der Gluconeogenese gebildetes FDP weist primär in den Positionen 1, 4 und 6 identische Tritiumaktivität auf, die der Aktivität der aus dem NADH-Pool markierten Wasserstoffpositionen entspricht. FDP reagiert weiter zu F6P, das durch schnelle Äquilibration mit Glucose-6-P (G6P) in der durch die Hexosephosphatisomerase katalysierten Reaktion Tritium aus der 1-Stellung mit Wasser austauscht. Wird dieses nur noch an den C-Atomen 4 und 6 markierte F6P über den "Futile cycle" teilweise zu FDP zurückverwandelt, kommt es zu einer Aktivitätsminderung auch in 1-Stellung von FDP. Von diesem Tritiumverlust wird nun auch die 6-Stellung von FDP bzw. der folgenden Hexosephosphate einschließlich der Glucose betroffen, vorausgesetzt, es findet eine rasche Äquilibration zwischen FDP und den Triosephosphaten Dihydroxyaceton-P und Glyceraldehyd-P (DAP, GAP) in den durch die Enzyme Aldolase und Triosephosphatisomerase katalysierten Reaktionen statt. Durch die letztgenannten Reaktionen ginge natürlich auch Tritiumaktivität aus der Stellung 4 des FDP bis hin zur Glucose verloren, es sei denn, daß GAP in der GAPDH-Reaktion rasch mit dem markierten NADH-Pool äquilibriert und Tritiumaktivität in der 1-Stellung (entsprechend der 4-Stellung der Hexosen) wieder auffüllt. Vereinfacht gesagt, findet parallel zur Gluconeogenese eine partielle Rückreaktion von F6P zu FDP in Form eines "Futile cycle" statt, führt der Tritiumverlust aus der 1-Stellung des F6P über mehrere Gleichgewichtsreaktionen zu einer Aktivitätsminderung in der 6-Stellung der Glucose. Erweitert man dieses System von Gleichgewichtsreaktionen auf die Schritte zwischen den Triosephosphaten und PEP, findet man eine

Erklärung auch für die Aktivitätsminderung in diesem Precursor.

Da in jüngster Zeit verschiedentlich Hinweise für die Existenz eines "Futile cycle" zwischen FDP und F6P auch unter physiologischen Bedingungen im Schrifttum erschienen sind (siehe Diskussionsteil), möchte ich hier kurz die Theorie anschneiden. "Futile cycles" stellen nach dem von NEWSHOLME et al. entwickelten Konzept Regulationsysteme im Stoffwechsel dar, die sich durch hohe Flexibilität und Effektivität auszeichnen. Sie werden dort postuliert, wo thermodynamisch irreversible Schritte in einer Hin- und Rückreaktion durch zwei oder mehrere verschiedene Enzyme, z.B. eine Kinase und eine Phosphatase, katalysiert werden (siehe Abb. 1). Voraussetzung für das Funktionieren eines solchen Systems ist ein geeigneter allosterischer Effektor, der auf beide Enzyme gleichzeitig und gegensinnig, d.h. auf eines aktivierend und auf das andere hemmend wirken kann. Nun läßt sich mathematisch beweisen, daß bei einer hohen Zirkulationsrate des "Futile cycle" bereits geringe Änderungen der Effektor-Konzentration den Nettofluß in einer Richtung sehr stark beeinflussen können, sehr viel stärker, als durch allosterische Regulation eines einzelnen Enzyms in Flußrichtung möglich wäre. Preis für diese sehr effektive Regulation ist die dabei in hohem Maße verbrauchte freie Energie, z.B. der Phosphatbindung im ATP, die den "Futile cycle" antreibt.

Was den uns hier speziell interessierenden "Futile cycle" zwischen FDP und F6P betrifft, für ihn wird AMP als Effektor diskutiert, das in vitro die FDPase inhibitiert, die PFK dagegen aktiviert. Fraglich ist, ob er in vivo den Nettofluß der Gluconeogenese kontrollieren kann, wenn, wie in der Einleitung dargestellt, die eigentlich geschwindigkeitslimitierenden Reaktionen an anderer Stelle, zwischen Pyruvat und Phosphoenolpyruvat, zu suchen sind. Allerdings könnte dieser "Futile cycle" mittelbar über die zelluläre FDP-Konzentration auch eine indirekte Kontrollfunktion wahrnehmen. Denn FDP ist ein allosterischer

Aktivator der Pyruvatkinase, und diese wiederum ist ja eine Komponente des Abschnittes der Gluconeogenese, der als geschwindigkeitslimitierend angesehen wird. ^{*)}

Wir waren davon ausgegangen, daß ein "Futile cycle" zwischen FDP und F6P die Ursache für die beobachtete Verminderung der Tritiumaktivität in 6-Stellung der Glucose sein könnte.

Unter der Annahme, daß FDP primär eine in 4- und 6-Stellung identische Tritiumaktivität aufwies (siehe oben), läßt sich aus den gemessenen Aktivitäten die Turnover-Rate des "Futile cycle" berechnen. Interessant ist dabei festzustellen a) ob unter den Bedingungen eines veränderten Nettoflusses durch die Gluconeogenese (z.B. bei Stimulierung durch Gabe von zyklischem AMP) der "Futile cycle" entsprechende Veränderungen zeigt, und b), ob die für den "Futile cycle" erforderliche Stoffwechselenergie mit dem gemessenen Sauerstoffverbrauch in Einklang zu bringen ist. In Tabelle 14 sind die Kalkulation der "Futile cycle"-Raten sowie der Sauerstoffverbrauch zusammengefaßt. Dazu ist einschränkend zu sagen, daß die Annahme einer vollständigen Äquilibrierung der Triosephosphat-Einheiten von FDP in der Triosephosphatisomerase-Reaktion, aus der sich ein Verdünnungsfaktor von 0,5 für T₆ ergibt, nicht unter allen Umständen zu gelten scheint (69). Weiterhin ist zu bedenken, daß kleine Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der spezifischen Tritiumaktivitäten, vor allem von T₆, zu großen Abweichungen der errechneten "Futile cycle"-Raten führen.

^{*)} zur Theorie der "Futile cycles" und der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels siehe NEWSHOLME et al. (4,7).

Tabelle 14

B e r e c h n u n g des "F u t i l e c y c l e" zwischen Fructose-6-P und Fructose-1,6-diP aus den Tritiumaktivitäten der 4- und 6-Stellung der neugebildeten Glucose sowie der Gluconeogeneserate.

T_4 = rel.spez. ^3H -Aktivität an C_4 , T_6 = rel.spez. ^3H -Aktivität an C_6 der Glucose

F = Futile_{cycle}-Turnover, G = Gluconeogeneserate ($\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g Leber}^{-1}$)

Wahrscheinlichkeit, mit der Fructose-6-P direkt zur Glucose weiterreagiert, ohne daß T_6 durch Futile cycle vermindert wird = $1 - x$

Wahrscheinlichkeit, mit der Fructose-6-P über Futile cycle zu Fructose-1,6-diP zurückreagiert, wobei T_6 um die Hälfte vermindert wird = x

$$\text{I.) } T_6 = T_4(1 - x) + T_4(1 - x) \frac{x}{2} + T_4(1 - x) \frac{x^2}{4} + \dots + T_4(1 - x) \frac{x^n}{2^n}$$

für $n \rightarrow \infty$ und $x \leq 1$:

$$\lim T_6 = 2T_4 \frac{(1-x)}{(2-x)}$$

$$\text{II.) } \frac{F}{G} = \frac{x}{1 - x} \quad \text{nach } x \text{ aufgelöst:}$$

$$x = \frac{F}{G + F} \quad \text{in I.) eingesetzt und nach F aufgelöst:}$$

$$\text{III.) } F = 2G \frac{T_4 - T_6}{T_6}$$

B = mit Lactat, C = mit Lactat und DBcAMP

	Versuch I		Versuch II		Versuch III
	B	C	B	C	B
Gluconeogenese	38	48	39	49	18
T_4	0,12	0,19	0,28	0,35	0,26
T_6	0,08	0,10	0,15	0,15	0,14
Futile cycle	38	86	68	131	31
Extra- O_2 für Futile cycle	6	14	11	22	5
Extra- O_2 für Gluconeogenese	38	48	39	49	18

Mit den erwähnten Vorbehalten kann festgestellt werden, daß die aus der Tritiummarkierung der Glucose kalkulierten "Futile cycle-Raten" größenordnungsmäßig im Bereich der Gluconeogenese liegen würden. Überraschenderweise errechnet sich unter cAMP eine Verdoppelung des "Futile cycle" bei gleichzeitiger Stimulierung der Gluconeogenese. Unter der Annahme einer regulatorischen Bedeutung des "Futile cycle" für den Gesamtfluß der Gluconeogenese wäre eher eine Abnahme zu erwarten gewesen. Inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen der Steigerung des "Futile cycle" und der Gabe des zyklischen Nucleotids besteht, muß offen bleiben. Denkbar wäre beispielsweise eine Stimulierung durch AMP (siehe oben), den zellulären Metaboliten von DBcAMP (70,8).

Tabelle 14 zeigt im übrigen, daß die für die errechneten "Futile cycle-Raten" erforderliche Stoffwechselenergie (O_2 -Verbrauch = $1/6 \times$ "Futile cycle-Rate" bei einem P/O von 3) nur einen geringen Anteil am gesamten Energieverbrauch ausmachen würde.

4. Diskussion

4.1. Zur Signifikanz der Wirkung von DBcAMP

Zunächst ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Arbeitskreise. Unter unseren Versuchsbedingungen liegen die mittleren Gluconeogeneseraten bei 120 mit Lactat bzw. 85 mit Pyruvat als Substrat (Werte jeweils in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g} \text{ Körpergewicht}^{-1}$). Eine Abhängigkeit von der relativen Perfusionsgeschwindigkeit ist hierbei feststellbar. Die von anderen Arbeitskreisen angegebenen Gluconeogeneseraten liegen zwischen 160 und 270 $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g}^{-1}$ (12,13,71,28) und sind für Lactat und Pyruvat etwa gleich (12,14). Diese wesentlich höheren Raten sind zu erklären durch 1.) eine in der Regel höhere Perfusionstemperatur (37°C) und 2.) ein Perfundieren im geschlossenen, rezirkulierenden System. WILLIAMSON et al. konnten zeigen, daß die Gluconeogeneseraten mit Xylit als Substrat bei offener Perfusion um 45 % niedriger lagen als im geschlossenen System (72). Gute Übereinstimmung besteht zwischen der in der Arbeit gezeigten mittleren Stimulierungsrate der Lactatgluconeogenese durch DBcAMP von 60 % und den von anderen Gruppen für Glucagon angegebenen 40 - 80 % (12,14,28). Daß dort im Unterschied zu unseren Experimenten eine ähnlich hohe Stimulierbarkeit der Gluconeogenese aus Pyruvat beobachtet wurde (12), soll später noch ausführlicher diskutiert werden (siehe 4.3.).

Die unter DBcAMP erhöhte Glucoseausschüttung ist Ausdruck einer Stimulierung der Gluconeogenese. Ob darüber hinaus noch eine durch das Nucleotid stimulierte Glycogenolyse stattfand, von Glycogen, das bereits nach Substratgabe gebildet wurde, ist nicht sicher auszuschließen, erfahrungsgemäß kann aber die hämoglobinfrei perfundierte Leber auch unter optimalen Bedingungen kein Glycogen bilden. Überraschend ist die in Abwesenheit eines glucogenen Substrates durch DBcAMP verursachte Atmungssteigerung. Sie kann auf eine gesteigerte endogene Lipolyse hindeuten, als Fettsäurequelle ist aber auch ein aus DBcAMP stammendes Butyrat in Betracht zu ziehen. Auffällig ist allerdings, daß gleichzeitig die Ketonkörperbildung unverändert blieb.

Man nimmt an, daß das Dibutyrylderivat des natürlich vorkommenden zyklischen Nucleotids in der Zelle zu biologisch aktivem N⁶-monobutyryl-cAMP deazyliert wird (70). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß DBcAMP in herkömmlichen Puffermedien, besonders leicht in Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer, spontan deazyliert (73). Eine stimulierende Wirkung von Butyrat auf die Gluconeogenese aus Lactat ist bekannt, dabei wirkt Glucagon additiv (74). Um einen solchen Butyrat-effekt abzuklären, der unter unseren Versuchsbedingungen möglicherweise den uns interessierenden cAMP-Effekt überlagerte, wurden Lebern gehungerter Tiere mit ansteigenden Butyratkonzentrationen bis 10 mM perfundiert (R. KRÄMER, P. WOLLENBERG und G. MÜLLHOFER, unveröffentlicht). Die erzielten Effekte waren bezüglich Glucosebildung und Sauerstoffverbrauch widersprüchlich, eine zusätzliche Infusion von DBcAMP oder Adrenalin (1 μ M) zeigte dagegen die bekannte Stimulierung. Es sei daran erinnert, daß die Titration der Gluconeogenese mit ansteigenden Konzentrationen von DBcAMP bis 1 mM eine Sättigungskurve mit maximaler Stimulierung bei etwa 80 μ M ergab (Abb. 6), ähnlich, wie das von EXTON et al. für cAMP beschrieben wurde (14). Mit 1 mM Butyrat allein konnte eine Stimulierung erzielt werden, additiv dazu aber noch eine weitere durch 80 μ M DBcAMP. Trotz der Vorläufigkeit dieser Ergebnisse kann dem DBcAMP also mit Sicherheit eine vom Butyrat unabhängige Wirkung zugeschrieben werden. Das Fehlen einer Stimulierbarkeit der Gluconeogenese aus Pyruvat durch DBcAMP spricht sogar gegen jegliche Butyratbeteiligung.

4.2. Der Glycerophosphatzyklus und die Wirkung von cyclischem AMP.

Zur Erklärung der Aktivitätsanreicherung in der 2-Stellung des α -Glycerophosphats wurde ein Isotopeneffekt der Glycerophosphatoxidase (GPOx) diskutiert, für das zyklische Nucleotid wurde eine stimulierende Wirkung auf dieses Flavoenzym

bzw. den Glycerophosphatzyklus postuliert. In der folgenden Abbildung ist die Kette der an diesem Zyklus beteiligten Reaktionen schematisch dargestellt und die Größe des Isotopeneffektes der GPOx angegeben.

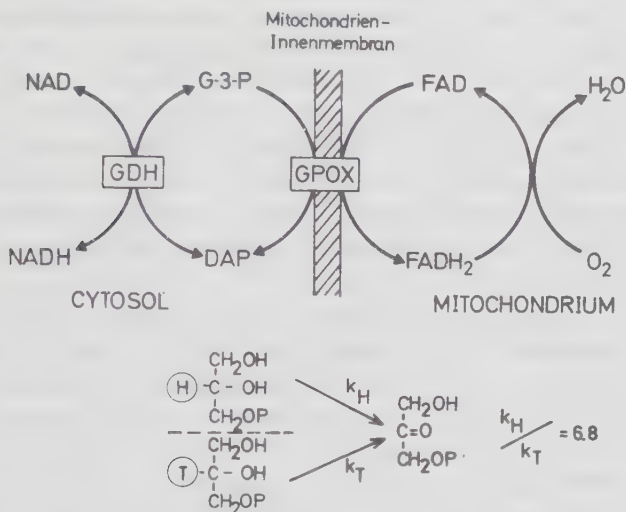


Abb. 9 Schematische Darstellung des Glycerophosphatzykus

Die Lokalisierung der GPOx an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran wurde von KLINGENBERG angegeben (75). Zur Berechnung des Isotopeneffektes der GPOx siehe MÜLLHOFER et al. (64). k_{H} und k_{T} sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Dehydrierung T des protonierten bzw. tritierten Substrates, ihr Quotient ergibt den Isotopeneffekt.

Es stellte sich die Frage, welche Argumente diese Hypothese untermauern könnten. In Fortsetzung dieser Arbeit wurden deshalb Untersuchungen an hyperthyreoten Tieren durchgeführt (64). Zunächst konnte man eine 7- bis 8fache Erhöhung der GPOx-Aktivität in der Leber gegenüber euthyreoten Tieren beobachten. Die Gluconeogeneseraten waren mit Lactat als

Substrat um etwa 125 % höher als in den Normalversuchen, mit DBcAMP war keine weitere Steigerung zu erreichen. Die Analyse des Markierungsmusters eines aktiven Experimentes ergab eine 5fache Aktivitätsanreicherung von Tritium in der 2-Stellung des α -GP gegenüber den übrigen Dehydrogenasepositionen. Schließlich wurde der Isotopeneffekt der GPOx bestimmt, dessen Wert von 6,8 zwangsläufig zu der Tritiumanreicherung im α -GP in Bezug gebracht werden mußte. Dazu jene Aktivitätszunahme der GPOx- es sprach alles für eine Steigerung des Glycerophosphatzyklus (64). Wie aber ließ sich eine wesentliche Bedeutung dieses Zyklus für den Leberstoffwechsel, insbesondere aber für die Gluconeogenese herstellen?

Bekanntlich folgt aus der relativen Undurchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Pyrimidinnucleotide die Notwendigkeit eines "Shuttle-Systems" für den Wasserstofftransport aus dem Cytosol in die Mitochondrien (76). Im Insektenflugmuskel konnte der Glycerophosphatzyklus als geeigneter Shuttle nachgewiesen werden (77), auch für die Rattenleber wurde ihm eine gewisse Bedeutung zugemessen (77-79), die später allerdings wieder angezweifelt wurde (80, 72, 81). An Stelle dessen wurde hier ein kombinierter Malat-Aspartat-Shuttle favorisiert (82, 80). Argumente waren im wesentlichen eine Inhibierbarkeit der Äthanoloxidation durch Rotenon, einen Hemmer der mitochondrialen NADH-Dehydrogenase, oder durch n-Butylmalonat, einen Hemmer des Malatcarriers (80), eine hohe Michaeliskonstante der GPOx für α -GP (81) und eine niedrige $V_{\max}$, die für nennenswerte Flüsse nicht auszureichen schien (83). Andererseits legte die nach Thyroxin-gabe beobachtete drastische Zunahme der GPOx-Aktivität in der Rattenleber (84) eine physiologische Bedeutung nahe. CEDERBAUM et al. konnten kürzlich an isolierten Lebermitochondrien mit rekonstruierten Shuttlesystemen etwa gleichhohe Transportkapazitäten für den Glycerophosphat-Malat-Aspartat- und einen neuerdings diskutierten Fettsäure-Shuttle nachweisen. In Kombination wirkten die Shuttle

additiv, vorherige Thyroxinbehandlung aktivierte den Glycerophosphatzyklus. Interessanterweise konnte Rotenon alle 3 Systeme in unterschiedlichem Ausmaße hemmen, ein Befund, der die Autoren veranlaßte, den Angriffspunkt dieses Hemmers in der Atmungskette neu zu definieren (85). Zu ähnlichen Schlüssen kam auch ZIMMER in Untersuchungen an der perfundierten Leber (86).

Aus der bei unterschiedlicher Schilddrüsenaktivität beobachteten Auslenkung von Gehaltsquotienten der cytosolischen Redox-Paare $\angle GP/DAP : Lac/Pyr$, die über ihre Dehydrogenasen mit dem cytosolischen Wasserstoffpotential gekoppelt sind (77, 87), dem Massenwirkungs-Gleichgewicht und den in Modellversuchen bestimmten Relaxationszeiten hatten BÜCHER et al. Flußraten von 60 (Euthyreose) bis $190 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (Hyperthyreose) für das GPOx-System in der Rattenleber kalkuliert (78). MÜLLHOFER et al. bestimmten an isolierten Lebermitochondrien euthyreoter Tiere in Gegenwart von Rotenon eine V_{max} von $72 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mit $\angle GP$ als Substrat (64), CEDERBAUM et al. geben für das rekonstruierte System eine Transportkapazität von $58 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ mit Äthanol als Wasserstoffdonator an (85). Für die Gluconeogenese aus Sorbit und Glycerin in isolierten Leberparenchymzellen kalkulierten BERRY et al. maximale Wasserstofftransportraten von $110 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, 50 % davon Rotenon-sensitiv, insgesamt aber nur 10 %, die über einen Malat-Aspartat-Shuttle laufen sollten (88). Nach Vorbehandlung mit Thyroxin war der H-Transfer um 50 bis 60 % gesteigert, die Rotenon-Empfindlichkeit nahm gleichzeitig ab (89). WILLIAMSON et al. kalkulierten in Perfusionsexperimenten mit Xylit als Substrat der Gluconeogenese in Gegenwart von Amobarbital Flußraten über den Glycerophosphatzyklus, die etwa 40 % des gesamten Wasserstofftransportes in die Mitochondrien ausmachten (72). Zusammenfassend ist zu sagen, daß an der physiologischen Funktion des Zyklus in der Leber kaum noch Zweifel bestehen.

Wir waren ausgegangen von der nach cAMP-Gabe zu beobachtenden Veränderung der LGP -Markierung, die wir mit einem erhöhten Fluß über die GPOx erklärten. Gibt es aber eine Beziehung zwischen der Stimulierung der Gluconeogenese und einem gesteigerten H-Transfer in die Mitochondrien? SCHIMASSEK fand an der perfundierten Leber eine Abhängigkeit des Lactatumsatzes von der Schilddrüsenfunktion (90), FREEDLAND et al. beschrieben maximale Gluconeogeneseraten mit Lactat als Substrat in Gegenwart von Glucagon und Butyrat erst nach vorheriger Thyroxinbehandlung (74). Glucagon und Butyrat wirkten dabei mehr als additiv, bei euthyreoten Tieren dagegen nur additiv. Zur Deutung dieser Befunde wurden Aktivitätsänderungen von Enzymen der Gluconeogenese diskutiert. MENAHAN et al. zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der Gluconeogenese aus Lactat von der Schilddrüsenfunktion (91). Hypothyreose senkte die Gluconeogeneseraten, Glucagon hatte daraufhin einen stärkeren stimulatorischen Effekt als nach Trijodthyroninbehandlung. Die Autoren diskutierten eine "permissive Rolle" des Schilddrüsenhormons für die Gluconeogenese in Analogie zu der Glucocorticoidwirkung (siehe Einleitung), aus Aktivitätsmessungen gluconeogener Enzyme schlossen sie auf eine Abhängigkeit der de novo-Synthese der Pyruvatcarboxylase von der Schilddrüsenfunktion. BÖTTGER et al. konnten darüber hinaus eine Abhängigkeit auch für die Enzyme Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase zeigen (92). Ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenaktivität und Gluconeogenese darf demnach als gesichert angenommen werden, kommt dabei aber der GPOx bzw. dem Glycerophosphatzyklus eine entscheidende Rolle zu? Würde auf diesem Wege vermehrt Wasserstoff in die Mitochondrien transferiert werden können, hätte das jedenfalls eine Positivierung des cytosolischen NADH-Potentials zur Folge. Untersuchungen von BODE et al. über den Äthanolabbau in der perfundierten Leber unter Hyperthyreosebedingungen unterstützen diese Annahme (93). Was hätte das aber für die Gluconeogenese zu bedeuten? Besteht eine Beziehung zwischen Gluconeogenese und cytosolischem Redoxpotential?

4.3. Gluconeogenese und Redoxpotential

Die hiermit angeschnittene Frage berührt ein weites Feld kontroverser Diskussion, auf die detailliert einzugehen den Rahmen der Arbeit sprengen würde. Eine Kontrolle der Gluconeogenese durch das cytosolische Wasserstoffpotential auf der Stufe der Triosephosphatdehydrogenasereaktion wurde mehrfach diskutiert (3,65), andererseits wurde die Meinung vertreten, daß das Wasserstoffpotential eher von der Gluconeogenese abhängt als umgekehrt (94). Identische Gluconeogeneseraten aus Lactat und Pyruvat (12-14) gelten als Hauptindiz für Kontrollmechanismen unabhängig vom jeweiligen Redoxgrad der Zelle. Ein Einwand dagegen muß allerdings geltend gemacht werden: die genannten Ergebnisse stammen fast ausschließlich aus Perfusionsexperimenten über eine längere Zeit im geschlossenen System, während der sich unabhängig vom Reduktionsgrad des verwendeten Substrates nahezu physiologische L/P's im Perfusionsmedium einstellten. Überspitzt formuliert, eine Gluconeogenese aus Pyruvat entspricht nach genügend langer Perfusionszeit der aus Lactat. Dann ist natürlich auch eine Stimulierbarkeit mit Glucagon (12,14) zu verstehen. Zwar konnte EXTON et al. auch im offenen System nahezu identische Gluconeogeneseraten aus Lactat und Pyruvat zeigen (13), die für halbmaximale Flußraten erforderlichen Substratkonzentrationen zeigten allerdings nur geringe Unterschiede (für Pyruvat 1 mM, für Lactat 2 mM), sodaß an einer grundsätzlichen Verschiedenheit beider Gluconeogenesetypen zu zweifeln ist. Nach SCHOLZ et al., dessen Perfusionssystem wir verwenden, liegen die Michaeliskonstanten niedriger als 0,1 mM für Pyruvat und bei 1 mM für Lactat (95). In einer späteren Arbeit konnte EXTON eine beträchtliche Verunreinigung der seinem Perfusionssystem zugesetzten Albuminfraktion mit Äthanol nachweisen (15), weshalb seine früheren Befunde zweifellos überprüft werden müssen. Denn Äthanol hemmt die Gluconeogenese aus Lactat (96,72), stimuliert dagegen die aus Pyruvat (14).

In Anbetracht der Schwierigkeit, Ergebnisse anderer Arbeitskreise mit stark abweichenden Perfusionstechniken und -systemen zum Vergleich heranzuziehen, muß sich die weitere Diskussion im wesentlichen auf unsere Daten beschränken. Geht man von der Vorstellung aus, daß ein nennenswerter Wasserstofftransfer über den Glycerophosphatzyklus durch Positivierung des cytosolischen NADH-Potentials zu einer Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat führen sollte, drängt sich die Frage nach den Folgen einer in vitro erzwungenen und exakt dosierbaren Änderung dieses Potentials auf. In Perfusionsexperimenten mit 5 mM Lactat konnte durch zusätzliche Infusion von Pyruvat im offenen System eine beträchtliche Stimulierung der Gluconeogenese erzielt werden. Eine nachträgliche Einstellung auf einen arteriellen L/P von 10 ergab eine mittlere Steigerungsrate von 100 %. Die daran anschließende Gabe von cAMP hatte eine Zunahme von unterschiedlicher Größe zur Folge, die zu dem vorausgegangenen Pyruvateffekt in einer inversen Beziehung stand: je deutlicher die Stimulierung auf Pyruvat war, desto geringer war der additive Effekt des Nucleotids. Unserer Ansicht nach erklären individuell unterschiedliche Stoffwechselleistungen, z.B. die Fähigkeit zum Einstellen eines für die Gluconeogenese optimalen Redoxpotentials, dieses Verhalten. Zwischen den Extremen einer reinen Lactat- bzw. Pyruvatperfusion, über einen weiten Bereich verschiedener arterieller L/P's betrachtet, zeigten die maximalen Gluconeogeneseraten in Gegenwart von DBcAMP einen phasischen Verlauf: von 191 (mit 5 mM Lactat) über 456 (5 mM Lactat + 0,5 mM Pyruvat), 288 (5 mM Lactat + 1 mM Pyruvat) bis 83 (5 mM Pyruvat), Werte in $\mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g}^{-1}$ (64). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen kürzlich GARRISON et al. in Untersuchungen mit isolierten Rattenleber-Parenchymzellen: die deutlichste Stimulierung der Gluconeogenese durch Glucagon bei einem L/P zwischen 3 und 10, eine geringere Gluconeogenese aus Pyruvat allein, dabei noch weitere Verlangsamung mit DBcAMP während der ersten 30 Minuten der Inkubation, später dann wieder eine geringfügige Steigerung. Letzterer Effekt kann zwanglos mit einer in dem ge-

geschlossenen System inzwischen eingetretenen Erhöhung des L/P erklärt werden. In Gegenwart von Äthanol war die Pyruvat-Gluconeogenese erhöht, DBcAMP konnte sie unabhängig von der Inkubationszeit noch weiter steigern (97). Eine Beziehung zwischen Gluconeogenese und Redoxpotential scheint demnach vorhanden zu sein, optimale Bedingungen dürften im Bereich des physiologischen L/P von 10 herrschen. Die eben diskutierten Befunde zusammenfassend und mit der beschriebenen Aktivitätsanreicherung im α -Glycerophosphat in Beziehung bringend sehen wir unsere Hypothese der Konsequenzen eines durch DBcAMP ausgelösten Flußanstieges über den Glycerophosphatzyklus in wesentlichen Ansätzen bestätigt. Worin liegt aber die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus?

4.4. Die Bedeutung von Wasserstoff- und Substrat-Shuttles für die Gluconeogenese aus Lactat

Es erscheint zunächst verwunderlich, eine Abhängigkeit der Gluconeogenese aus Lactat von einem Wasserstofftransfer in die Mitochondrien zu postulieren, denn die bei der Umwandlung zu Pyruvat im Cytosol freigesetzten Reduktionsäquivalente sollten bei der im weiteren Verlauf stattfindenden Reduktion von Phosphoglycerat zum Glyceraldehydphosphat wieder stöchiometrisch verbraucht werden. Zwei Mechanismen sind denkbar:

1.) könnte dadurch ein Anstieg der zellulären Pyruvat- und Oxalacetatkonzentration erreicht werden, der den Enzymen Pyruvatcarboxylase (PC) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) ein Operieren im Bereich der Substratsättigung ermöglichte. 2.) würde es eine Senkung der cytosolischen Malatkonzentration zur Folge haben, durch die ein energieabhängiger Transport von Malat aus den Mitochondrien (98) erleichtert werden sollte.

Die Flußgeschwindigkeit in einer Reaktionskette wird durch den ersten geschwindigkeitslimitierenden Schritt bestimmt. In der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat ist die mitochondriale Carboxylierung von Pyruvat die erste irreversible Reaktion, viele Autoren postulierten an dieser Stelle den Ort

der Regulation (Übersicht siehe Ref. 2,4). Andere Faktoren, deren physiologische Bedeutung sehr kontrovers beurteilt wird (siehe Einführung), einmal außer acht lassend, die Aktivität der Pyruvatcarboxylase wird durch die Substratkonzentration bestimmt. Diese aber sollte über den L/P mit dem cytosolischen Redoxpotential gekoppelt sein, was z.B. die Hemmwirkung von Äthanol auf die Gluconeogenese aus Lactat erklären könnte (96).

Nach SÖLING et al. beträgt der K_M -Wert der PC für Pyruvat 0,25 mM (99), er liegt damit im Bereich der in unseren Lactatversuchen für den Intrazellulärraum kalkulierten Pyruvatkonzentrationen. Eine Senkung des L/P könnte also unter unseren Versuchsbedingungen die Pyruvatcarboxylierung und folglich die Gluconeogenese beschleunigen. Andererseits kann die Gluconeogenese in der Rattenleber durch Fettsäuren, die einen starken Anstieg des L/P verursachen, beträchtlich gesteigert werden (71). Demnach ist die cytosolische Pyruvatkonzentration, die durch den L/P vorgegeben wird, von untergeordneter Bedeutung. In Anbetracht der mitochondrialen Lokalisierung der PC und Befunden, die für einen Pyruvat-carrier in der Mitochondrienmembran sprechen (17,18), muß im übrigen eher die Pyruvatpermeation als limitierende Größe für die Carboxylierungsreaktion diskutiert werden. Untersuchungen von ADAM et al., die eine deutliche Steigerung der Pyruvataufnahme in isolierte Lebermitochondrien nach vorheriger Gabe von Glucagon oder Adrenalin zeigten (19), weisen ebenfalls in diese Richtung.

In der zweiten irreversiblen Reaktion der Gluconeogenese aus Lactat wird Oxalacetat zu PEP decarboxyliert. EXTON et al. diskutierten diesen Schritt als geschwindigkeitslimitierend, darüber hinaus auch als Angriffsort der Glucagonwirkung (27, 38). Am isolierten Enzym, der PEPCK, konnte allerdings nie ein cAMP-Effekt ähnlich dem Phosphorylasesystem nachgewiesen werden, zudem wurden grundsätzliche Einwände gegen das Exton'sche Konzept vorgebracht (99,40). Theoretisch besteht immerhin die Möglichkeit, diese Reaktion über das Substratangebot, d.h. die vom Redoxgrad abhängige Oxalacetatkonzentration am Enzymort zu regulieren. Allerdings gilt auch hier wieder als Gegenargument die Stimulierbarkeit der Gluconeo-

genese durch Fettsäuren bei gleichzeitigem Anstieg des L/P und Absinken der Oxalacetat-Konzentration. Es ist also nun die zweite Hypothese zu überprüfen, daß eine Senkung der cytosolischen Malatkonzentration bei erhöhtem Wasserstofffluß über den Glycerophosphatzyklus den Malattransport aus den Mitochondrien erleichtere.

Es wird allgemein akzeptiert, daß Oxalacetat die Mitochondrienmembran nur beschränkt permeieren kann (98,100). Dies macht einen Shuttlemechanismus notwendig, mit dessen Hilfe das Kohlenstoffskelett von Oxalacetat ins Cytosol befördert werden kann. Für die Gluconeogenese aus Pyruvat wurde Malat als Shuttlesubstanz postuliert, das gleichzeitig auch den Wasserstofftransfer besorgen sollte (101), für die Lactatgluconeogenese dagegen Aspartat (82), das über eine entsprechende Transaminase-Reaktion beiderseits der Membranbarriere mit Oxalacetat im Gleichgewicht steht. In Perfusionsexperimenten konnte mit Hilfe des Transaminaseinhibitors Aminooxyacetat dieses Konzept bestätigt werden, es kam zu einer Hemmung der Gluconeogenese aus Lactat, die Gluconeogenese aus Pyruvat dagegen blieb unverändert (102,71). Es sei am Rande erwähnt, daß diese Shuttlesysteme in der Literatur üblicherweise als "Malat-Oxalacetat- bzw. Glutamat-Aspartat-Shuttle" bezeichnet werden.

Das zunächst einfach erscheinende Modell wird durch die Tatsache kompliziert, daß gleichzeitig mit Aspartat als Shuttlesubstanz für den C_4 -Transfer äquivalente Mengen von α -Ketoglutarat (α -KG), dem zweiten Substrat für die cytosolische Transaminierungsreaktion, mitbefördert werden müssen, α -KG andererseits nur bei gleichzeitigem Gegentransport von Malat die Mitochondrien verlassen kann. In der Bilanz der C_4 -Körper findet bis jetzt kein Nettofluß statt, es kommt lediglich zum Transport von Wasserstoff in die Mitochondrien. Der für die Gluconeogenese notwendige C_4 -Export kommt erst dann zustande, wenn Malat wieder im Austausch gegen Phosphat oder Citrat über spezifische Carriersysteme ins Cytosol zurückgelangt. Für den Aspartattransfer gibt es im übrigen

einen ähnlichen Mechanismus, der Austausch erfolgt hier gegen cytosolisches Glutamat (zur Übersicht siehe Ref. 103). Es stellt sich die Frage, ob dieses komplexe System carrier-abhängiger Transporte unter physiologischen Bedingungen arbeitsfähig ist. Aspartat- und Malattransfer sind energieabhängig, sie können durch Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung und Inhibitoren des Elektronentransportes gehemmt werden (85,104), - das gleiche dürfte auch für andere Shuttles gelten. Der Vorteil dieses Systems ist zweifellos, daß in der Nettobilanz lediglich das Kohlenstoffskelett, aber keine Reduktionsäquivalente befördert werden, das Cytosol während der Lactatgluconeogenese also vor überschüssigem Wasserstoff bewahrt bleibt. (In umgekehrter Richtung kann so während der Gluconeogenese natürlich ebenfalls kein Wasserstoff transportiert werden.) Dieser Vorteil, der nur durch einen hohen Grad an Komplexität und Organisiertheit möglich wird, dürfte andererseits durch eine aufwendige Regulation und damit auch Störanfälligkeit belastet sein.

Als beweisend für das tatsächliche Funktionieren dieses Shuttlesystems werden Hemmversuche mit Aminoxyacetat (AOA) angesehen, andererseits wurden auch Einwände gegen solche Versuche vorgebracht. LONGSHAW et al. diskutierten die Möglichkeit, daß AOA als ein Hydroxylamin-Derivat Oxim-Verbindungen mit den Carbonylgruppen von Ketosäuren wie Pyruvat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat eingehen könnte (105). Mit Lactat als Substrat der Gluconeogenese, demzufolge hohem Reduktionsgrad der Pyridinnucleotide und niedrigen Ketosäurekonzentrationen, könnte AOA die steady state-Konzentrationen wesentlicher Intermediate der Gluconeogenese weiter erniedrigen, den Fluß durch die Gluconeogenese damit zum Erliegen bringen, umgekehrt könnte mit Pyruvat als Substrat und hohen Ketosäurekonzentrationen AOA aus dem Gleichgewicht mit den Transaminasen entfernt, seine Hemmwirkung damit blockiert werden. Dieser Möglichkeit wurde wiederum unter angenähert physiologischen Versuchsbedingungen wenig Bedeutung beigemessen (105,86).

Hemmversuche mit n-Butylmalonat, einem spezifischen Inhibitor des Malat/Phosphat- und Malat/Tricarboxylatcarriers, zeigen jedenfalls, daß Malat in der Gluconeogenese aus Lactat wie aus Pyruvat über die Mitochondrienmembran transferiert werden muß (102, 108). Von unserem Arbeitskreis wurde Malat als ausschließliche Shuttlesubstanz für Oxalacetat während der Gluconeogenese postuliert (42,30). Entscheidendes Argument war die gute Übereinstimmung der Tritium- und ^{14}C -Aktivitäten von Malat und Glucose sowie anderer Intermediate der Gluconeogenese, während Aspartat ebenso wie Glutamat eine wesentlich geringere Aktivität aufwies (siehe auch Tab. 11). Später konnten auch WILLIAMSON et al. und EXTON et al. eine vergleichsweise nur geringe Aspartataktivität zeigen (102,38), für die es im übrigen bislang keine befriedigende Erklärung gibt.

Kürzlich konnten BERRY et al. an isolierten Leberparenchymzellen mit Hilfe spezifischer Hemmer der Malatdehydrogenase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zeigen, daß beide, Malat- wie Aspartatshuttle, in unterschiedlichem Ausmaße an der Gluconeogenese aus Lactat oder Pyruvat beteiligt sind. Die Autoren schlossen im übrigen, daß diese Shuttles geschwindigkeitslimitierend für die Gluconeogenese werden können (106). EXTON et al. und ROOBOL et al. waren in Untersuchungen an der perfundierten Rattenleber bzw. an Nierenrindenschnitten zu ähnlichen Feststellungen gekommen, sie vermuteten darüber hinaus eine Regulation dieser Shuttlemechanismen durch zyklisches AMP (38,107).

Wir konnten zeigen, daß das cytosolische Wasserstoffpotential die Flußgeschwindigkeit der Gluconeogenese wesentlich beeinflussen kann. Erfolgt während der Lactat-Gluconeogenese ein nennenswerter H-Transfer über den Malat-Shuttle in das Cytosol, kann sich die Notwendigkeit ergeben, überschüssige Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien zurückzutransportieren. Veränderungen der cytosolischen Pyruvat- und Oxalacetatkonzentrationen mögen die Folge sein, sie scheinen aber

für die Gluconeogenese nur von untergeordneter Bedeutung zu sein (siehe oben). Stattdessen sehen wir in einer Änderung der cytosolischen Malatkonzentration mit nachfolgender Änderung des Malattransfers aus den Mitochondrien den entscheidenden Vorgang. WILLIAMSON et al. kalkulierten im Falle der Gluconeogenese aus Lactat einen nur geringen Konzentrationsgradienten von Malat zwischen Mitochondrien und Cytosol. Nach Gabe von Fettsäuren stiegen zwar cytosolisches wie mitochondriales Wasserstoffpotential, das mitochondriale aber relativ stärker, sodaß sich der Malatgradient erhöhte. Gleichzeitig war die Gluconeogenese beschleunigt (33). Bei einem Rücktransport von Wasserstoff über den von uns vorgeschlagenen Glycerophosphatzyklus könnte auf zweierlei Art der Malatgradient erhöht werden: 1.) durch Senkung der cytosolischen NADH- und somit Malatkonzentration und 2.) durch Hemmung der mitochondrialen NADH-Dehydrogenasereaktion und/oder einen umgekehrten Wasserstofffluß über die Atmungskette mit nachfolgendem Anstieg der mitochondrialen NADH- und folglich Malatkonzentration. Die grundsätzliche Möglichkeit eines solchen energieabhängigen "reversed electron transfer" konnte von BERRY an isolierten Leberzellen demonstriert werden (104).

4.5. "Futile cycles" in der Gluconeogenese

Es wurde diskutiert, daß für die Markierungsverteilung von Tritium in der neugebildeten Glucose ein "Futile cycle" zwischen Fructose-6-Phosphat und Fructose-1,6-diphosphat verantwortlich gemacht werden kann, wenn auch nur mangels anderer Erklärungsmöglichkeiten. Bei fraglicher Existenz ist erst recht seine physiologische Bedeutung dubios, wenn er bei gesteigertem Fluß durch die Gluconeogenese ebenfalls zunimmt. Andererseits, neuere von ROGNSTAD et al. an isolierten Leberparenchymzellen gewonnene Daten lassen sich nur mit einem "Futile cycle" erklären. Sie zeigen eine gewisse Abhängigkeit von der diätetischen Situation: unter

Gluconeogenesebedingungen eine deutliche Verringerung des Rezyklisierens von Hexosephosphaten (108,109). Untersuchungen am Ganztier brachten eine weitere Bestätigung für das Existieren eines Futile cycle, zeigten aber auch, daß er nur unter extremen Bedingungen wie Anoxie in nennenswertem Umfang abläuft. Die regulatorische Bedeutung von AMP als Hemmer der FDPase und Aktivator der PFK sowie von ATP und Citrat als Hemmer der PFK wurden in diesem Zusammenhang ausführlich diskutiert (110). Diese Arbeiten scheinen demnach unsere an der perfundierten Leber gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung stellt allerdings die Schlüssigkeit der unserer Futile cycle-Berechnung zugrunde liegenden Voraussetzungen in Frage. In einer systematischen Untersuchung der Tritiuminkorporation in die Glucose aus verschiedenen Substraten cytosolischer und mitochondrialer Dehydrogenasen wurde gezeigt, daß das Markierungsverhältnis in den Positionen 4 und 6 der Glucose von der zellulären Lokalisation der Wasserstoffübertragung abhängt. Bei primär mitochondrialer Markierung des NADH lag der Tritiumeinbau in C_6 der Glucose über dem in C_4 , und umgekehrt bei cytosolischer Markierung (111). Frühere Untersuchungen von HOBBERMAN am Ganztier zeigten ähnliche Verhältnisse (112). Diese Befunde lassen sich nur durch eine limitierte Äquilibrierung von cytosolischem und mitochondrialem NADH erklären - gegensätzliche Ergebnisse, die an isolierten Nierentubuli gewonnen wurden (113), scheinen dies auf die Leber zu beschränken. Überraschenderweise zeigte tritiiertes Malat, das über eine cytosolische Dehydrogenase Tritium in die Glucose inkorporieren kann, ein den ausschließlich mitochondrial markierenden Substraten identisches Markierungsverhältnis (111). Um hierfür eine Erklärung zu finden, müßte man eine Kompartimentierung des cytosolischen Oxalacetat-Pools fordern: ein gluconeogenetischer, mit mitochondrialem Oxalacetat im Austausch stehender Pool, und ein zweiter, mit cytosolischem Malat äquilibrieren-

der, vom anderen aber streng getrennter Pool. Die von uns gezeigte identische ¹⁴C-Markierung von Malat, PEP, Citrat und der Trioseeinheit der Glucose spricht gegen diese Erklärung (siehe auch Ref. 30).

Von der Problematik des eben Erörterten einmal abgesehen, aus unserer Futile cycle-Kalkulation schlossen wir auf eine Beschleunigung durch DBcAMP. Andererseits konnten wir an einer größeren Zahl von Versuchen eine Ökonomisierung des Sauerstoffverbrauches zeigen (siehe 3.1.). Mit einer gleichzeitigen Hemmung anderer Extraenergie verbrauchender Prozesse, z.B. eines "Futile cycle 1" zwischen PEP und Pyruvat, könnte diese Diskrepanz erklärt werden (39,40).

4.6. Der Mechanismus der cAMP-Wirkung auf die Gluconeogenese

Nach unserer Vorstellung stimuliert cAMP die Gluconeogenese aus Lactat über einen Mechanismus, der den Transfer von Malat, den cytosolischen Precursor der Gluconeogenese, aus den Mitochondrien heraus erleichtert. Durch einen gesteigerten Fluß über den Glycerophosphatzzyklus werden die aus dem Malat im Überschuß stammenden Reduktionsäquivalente in die Mitochondrien zurücktransportiert, es wird auf diese Weise gewissermaßen ein Sog auf den Malatfluß ausgeübt.

In Gegenwart von Pyruvat als glucogenem Substrat kommt es durch Lactatbildung zu einem massiven Verlust der Zelle an Reduktionsäquivalenten, die Flußgeschwindigkeit der Gluconeogenese wird in der Triosephosphatdehydrogenase - (GAPDH)-Reaktion limitiert. DBcAMP kann diesen Wasserstoffverlust durch eine Stimulierung der Lipolyse endogenen Fettes in begrenztem Umfang kompensieren, kann durch vermehrtes Rezyklisieren über den Glycerophosphatzzyklus Reduktionsäquivalente zusätzlich einsparen. Der Lactatverlust wird infolgedessen verringert, ein Rückgang im Pyruvatverbrauch durch Hemmung der Pyruvatoxidation zeigt möglicherweise einen zusätzlichen Spareffekt an, insgesamt bleibt aber die GAPDH-Reaktion weiterhin limitiert, die Wirkung des cyclischen Nucleotids manifestiert sich nicht in einer Stimulierung der Gluconeogenese.

Die Perfusion mit hohen Pyruvatkonzentrationen stellt die Leber zweifellos vor gänzlich ungewohnte Aufgaben, sie provoziert eine metabolische Situation fernab jeder physiologischen Wahrscheinlichkeit - es kann nicht überraschen, wenn in diesem Fall die physiologisch sinnvolle Antwort, vermehrte Glucosebildung auf Hormon- bzw. cAMP-Gabe, ausbleibt.

Der molekulare Wirkmechanismus von cAMP kann mit dieser Arbeit nicht geklärt werden, die von uns diskutierten metabolischen Änderungen können aber in eine bestimmte Richtung weisen. Als umfassendes Wirkungsprinzip gilt heute die allosterische Aktivierung von Proteinkinasen, die zum ersten Mal am Phosphorylasesystem des Muskels nachgewiesen wurde und zur Entdeckung von cAMP führte, inzwischen bei verschiedenen Zelltypen und Spezies bis zu Mikroorganismen und Pflanzen nachgewiesen werden konnte (8,114). Ein noch weitergehendes und das Proteinkinase-Konzept verallgemeinerndes und ergänzendes Modell wurde von RASMUSSEN entwickelt. Von der Tatsache ausgehend, daß in nahezu allen daraufhin untersuchten Systemen Hormon- bzw. cAMP-spezifische Reaktionen nur in Gegenwart von Calciumionen stattfinden und zu jeweils typischen Änderungen der extra- und intrazellulären Calciumkonzentrationen führen, schloß er auf ein allgemeines Regulationsprinzip. Danach solle cAMP durch Änderung von Membranstrukturen die Membranbindung und -Permeationsfähigkeit und folglich die intrazelluläre Verteilung ionisierten Calciums regulieren, Nucleotid und Kation sollten sich darüber hinaus an ihrem Wirkungsort, Proteinkinasen und anderen Enzymen, kooperativ beeinflussen und ergänzen (115,116).

Die perfundierte Rattenleber reagiert auf cAMP-Gabe prompt mit einer Ca^{++} -Abgabe und geringfügigen K^{+} -Aufnahme, Es folgt ein stärkerer Kaliumausstrom, begleitet von einer Hyperpolarisierung der Zellmembran, und schließlich die Ausschüttung der Glucose (117-119). Mit dem Lokalanästheticum Tetracain sind die genannten cAMP-Effekte hemmbar. Es wurde postuliert, daß Calcium durch cAMP aus dem mitochondrialen Kompartiment

mobilisiert wird, in das es energieabhängig akkumulieren kann, und daß eine Umverteilung von Ca^{++} zwischen den verschiedenen zellulären Fraktionen in Verbindung mit Änderungen des Membranpotentials schließlich zur Stimulierung der Gluconeogenese führt (117,119).

Beziehungen zwischen Gluconeogenese, Ca^{++} - und cAMP-Effekten wurden ausführlich von EXTON et al. diskutiert, die "permissive Rolle" glucocorticoider Hormone wurde, abgesehen von ihrer induktiven Wirkung auf Enzyme der Gluconeogenese, auch im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des zellulären Ionenmilieus, insbesondere des Calciums, betrachtet (6). ROOBOL et al. kamen kürzlich in Untersuchungen über die stimulierende Wirkung von Ca^{++} und cAMP auf die Gluconeogenese der Niere zu dem Schluß, daß der Transfer von C_4 -Precursoren über die Mitochondrienmembran als geschwindigkeitslimitierender Schritt hier beschleunigt sei (107). Eine Beziehung zwischen dem energieverbrauchenden Malat/Oxalacetat-Transport und gleichgerichteten Kationen - oder entgegengerichteten Anionenflüssen war früher bereits von HASLAM et al. diskutiert worden (98).

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien abschließend einige bekannte in vitro-Effekte von Calcium auf Enzyme der Gluconeogenese und ihr nahestehender Stoffwechselwege aufgezählt: Hemmung der Pyruvatcarboxylase (PC) und Isocitratdehydrogenase (29,120), Aktivierung der (die Pyruvatdehydrogenase aktivierenden) PDH-Phosphatase (121), Hemmung der Pyruvatkinase (122), Aktivierung der GPOx (123). Eine durch cAMP verursachte Senkung des mitochondrialen und Erhöhung des cytosolischen Calciumspiegels könnte somit bei einer zwanglosen Betrachtungsweise die Stimulierung der Gluconeogenese als Resultat mehrerer Teileffekte erklären: einer Enthemmung der PC, der Startreaktion der Gluconeogenese, und des Citratzyklus, einer Stimulierung des Glycerophosphatzyklus und einer Hemmung der Pyruvatoxidation und des Futile cycle zwischen PEP und Pyruvat. Die Komplexität des in der Arbeit behandelten Stoffwechselgeschehens und die Mannigfaltigkeit experimentell abgesicherter Regulationsmechanismen müssen allerdings eine solche Vereinfachung als sehr bedenklich erscheinen lassen.

Zusammenfassung

An isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Lebern 48 Stunden gehungerter Ratten wurde die Gluconeogenese aus 5 mM L-Lactat bzw. Pyruvat und ihre Stimulierbarkeit durch $80 \mu\text{M N}^6\text{-2'-O-dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat}$ (DBcAMP) untersucht. Die Gluconeogenese aus Lactat betrug im Mittel $120 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g Körpergewicht}^{-1}$, sie war durch DBcAMP um weitere 60 % zu steigern. Aus Pyruvat dagegen betrug sie $85 \mu\text{Mol} \times \text{h}^{-1} \times 100 \text{ g Körpergewicht}$ und ließ sich durch das zyklische Nucleotid nicht weiter steigern.

Aus dem gemessenen Sauerstoffverbrauch konnte in den Lactatversuchen eine gute Stöchiometrie zwischen Gluconeogenese und Mehratmung entsprechend einem theoretischen P:O von 3 kalkuliert werden, wobei unter DBcAMP eine gewisse Ökonomisierung des Energieverbrauchs eintrat. Die aus den Produktionsraten einiger Metabolite sowie der Sauerstoffaufnahme kalkulierten Citratzyklus-Turnoverraten lassen vermuten, daß ein Mehrbedarf an Stoffwechselenergie im wesentlichen über eine Steigerung des Citratzyklus gedeckt wurde.

Im Falle der Pyruvatversuche lag der Sauerstoffverbrauch erheblich - ohne DBcAMP um 79 %, mit DBcAMP um 40 % - über dem für die Gluconeogenese erforderlichen Energiebedarf, möglicherweise Ausdruck eines Substratflusses über einen "Futile cycle" zwischen Pyruvat und Phosphoenolpyruvat. Unter DBcAMP auch hier eine geringe Ökonomisierung, daneben auch eine Verringerung der Pyruvatoxidation, die als wesentlicher Energielieferant neben dem Citratzyklus kalkuliert wurde.

Zur weiteren Charakterisierung einiger zellulärer Ereignisse während der durch DBcAMP stimulierten Gluconeogenese aus Lactat wurden Isotopenexperimente mit $2\text{-}^3\text{H}\text{-}2\text{-}^{14}\text{C}\text{-L-Lactat}$ unter sonst identischen Perfusionsbedingungen durchgeführt.

Aus dem Lebergewebe und dem venösen Perfusionsmedium wurden einige Metabolite isoliert und hinsichtlich der Markierungsverteilung in einzelnen Wasserstoff- und Kohlenstoffpositionen analysiert. Gegenüber Versuchen ohne Stimulierung mit DBcAMP zeigten sich nennenswerte Aktivitätsveränderungen nur bei der ^{14}C -Markierung der Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie bei der Tritiummarkierung des α -Glycerophosphats. Es wurden daraus folgende Schlüsse gezogen und ausführlich diskutiert:

- 1) Lipolyse, Glycogenolyse und Pentosephosphatzzyklus werden unter unseren Versuchsbedingungen durch das zyklische Nucleotid nicht nennenswert verändert.
- 2) Intermediate der Gluconeogenese und des Citratzyklus werden über einen gemeinsamen Oxalacetatpool markiert.
- 3) In Gegenwart von DBcAMP findet eine beschleunigte Äquilibrierung verschiedener Aminosäurepools statt.
- 4) DBcAMP steigert den Umsatz von α -Glycerophosphat in der Glycerophosphatoxidase-Reaktion und damit den Transfer von Wasserstoffäquivalenten aus dem Cytosol in die Mitochondrien. Als Folge davon tritt eine Änderung des cytosolischen Redoxpotentials ein, die schließlich zu einer Zunahme der Gluconeogenese führt. Als limitierende Größe hierbei wird der Malattransport aus den Mitochondrien in das Cytosol postuliert.
- 5) Für eine Regulierung der Flußgeschwindigkeit der Gluconeogenese durch einen "Futile cycle" in Höhe der Hexosephosphate gibt es keinen eindeutigen Anhalt.

Literaturverzeichnis

- (1) Exton, J.H., Mallette, L.E., Jefferson, L.S., Wong, E.H.-A., Friedmann, N., Miller, T.B., Jr., und Park, C.R. Recent Progr. Hormone Res. 26, 411 (1970)
- (2) Scrutton, M.C. und Utter, M.F. Annu. Rev. Biochem. 37, 249 (1968)
- (3) Krebs, H.A. Proc. Roy. Soc. Ser. B 159, 545 (1964)
- (4) Newsholme, E.A. und Gevers, W. Vitamins and Hormones 25, 1 (1967)
- (5) Exton, J.H., Friedmann, N., Wong, E.H.-A., Brineaux, J.P., Corbin, J.G. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 247, 3579 (1972)
- (6) Exton, J.H., Corbin, J.G. und Harper, S.C. J. Biol. Chem. 247, 4996 (1972)
- (7) Newsholme, E.A. und Start, C. "Regulation in Metabolism", J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto (1973)
- (8) Robison, G.A., Butcher, R.W. und Sutherland, E.W. "Cyclic AMP", Academic Press, New York, London (1971)
- (9) Exton, J.H., Robison, G.A., Sutherland, E.W. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 246, 6166 (1971)
- (10) Exton, J.H., Jefferson, L.S., Butcher, R.W. und Park, C.R. Amer. J. Med. 40, 709 (1966)
- (11) Exton, J.H., Lewis, S.B., Ho, R.J. und Park, C.R. Adv. Cycl. Nucl. Res. 1, 91 (1972)
- (12) Ross, B.D., Hems, R. und Krebs, H.A. Biochem. J. 102, 942 (1967)
- (13) Exton, J.H., und Park, C.R. J. Biol. Chem. 242, 2622 (1967)
- (14) Exton, J.H. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 243, 4189 (1968)
- (15) Exton, J.H. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 244, 1424 (1969)
- (16) Mallette, L.E., Exton, J.H. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 244, 5724 (1969)
- (17) Papa, S., Francavilla, A., Paradies, G. und Meduri, B. FEBS Lett. 12, 285 (1971)
- (18) Paradies, G. und Papa, S. 9th Int. Congr. Biochem., Stockholm, Abstract 515 (1973)

- (19) Adam, P.A.J. und Haynes, R.C., Jr. J. Biol. Chem. 244, 6444 (1969)
- (20) Haugaard, E.S. und Haugaard, N. J. Biol. Chem. 206, 641 (1954)
- (21) Utter, M.F. und Keech, D.B. J. Biol. Chem. 238, 2603 (1963)
- (22) Struck, E., Ashmore, J. und Wieland, O. Adv. Enzyme Regul. 4, 219 (1966)
- (23) Williamson, J.R., Herczeg, B.E., Coles, H.S. und Danish, R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 437 (1966)
- (24) Williamson, J.R., Browning, E.T., Scholz, R., Kreisberg, R.A. und Fritz, I.B. Diabetes 17, 194 (1968)
- (25) Bewsher, P.D. und Ashmore, J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 431 (1966)
- (26) Claycomb, W.C. und Kilsheimer, G.S. Endocrinology 84, 1179 (1969)
- (27) Exton, J.H., Corbin, J.G. und Park, C.R. J. Biol. Chem. 244, 4095 (1969)
- (28) Fröhlich, J. und Wieland, O. Horm. Metab. Res. 4, 171 (1972)
- (29) Seufert, D., Herlemann, E.-M., Albrecht, E. und Seubert, W. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 459 (1971)
- (30) Müllhofer, G. und Kuntzen, O. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1461 (1972)
- (31) Wieland, O., Patzelt, Ch. und Löffler, G. Eur. J. Biochem. 26, 426 (1972)
- (32) Williamson, J.R., Olson, M.S., Browning, E.T. und Scholz, R. "The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria" (S. Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello und E.C. Slater, Ed.) Adriatica Editrice, Bari, S. 207, (1969)
- (33) Williamson, J.R., Scholz, R. und Browning, E.T. J. Biol. Chem. 244, 4617 (1969)

- (34) Regen,D.M. und Terrell,E.B. Biochim. Biophys. Acta 170, 95 (1968)
- (35) Ui,M., Exton,J.H. und Park,C.R. J. Biol. Chem. 248, 5350 (1973)
- (36) Shrago,E., Lardy,H.A., Nordlie,R.C. und Foster,D.O. J. Biol. Chem. 238, 3188 (1963)
- (37) Scholz,R., Hansen,W. und Thurman ,R.G. Eur. J. Biochem. 38, 64 (1973)
- (38) Ui,M., Claus,T.H., Exton,J.H. und Park,C.R. J. Biol. Chem. 248, 5344 (1973)
- (39) Friedman,B., Goodman,E.H.,Jr., Saunders,H.L., Kostos,V. und Weinhouse,S. Arch. Biochem. Biophys. 143, 566 (1971)
- (40) Williamson,J.R., Jakob,A. und Scholz,R. Metabolism 20, 13 (1971)
- (41) Blair,J.B., Cook,D.E. und Lardy,H.A. J. Biol. Chem. 248, 3601 (1973)
- (42) Müllhofer,G., Kuntzen,O., Hesse,S. und Bücher,Th. FEBS Lett. 4, 33 (1969)
- (43) Müllhofer,G., Kuntzen,O., Hesse,S. und Bücher,Th. FEBS Lett. 4, 47 (1969)
- (44) Hesse,S. Thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, München (1970)
- (45) Scholz,R. "Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber" (W. Staib und R.Scholz,Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 25 (1968)
- (46) Krebs,H.A. und Henseleit,K. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.,210, 33 (1932)
- (47) Scholz,R., Schwarz,F. und Bücher,Th. Z. Klin. Chem. 4, 179 (1966)

- (48) Wollenberger, A., Ristau, O. und Schaffa, G. Pfluegers Arch. ges. Physiol. 270, 399 (1960)
- (49) Hoberman, H.D. und D'Adamo, A.F., Jr. J. Biol. Chem. 235, 523 (1960)
- (50) "Methoden der enzymatischen Analyse", H.U. Bergmeyer, Ed., 2. Auflage, Verlag Chemie GmbH, Weinheim /Bergstr. (1970)
- (51) Hempel, K. Atompraxis 10, 148 (1964).
- (52) Hoberman, H.D. Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 1070 (1965)
- (53) Hoberman, H.D. und Prosky, L. Biochim. Biophys. Acta 148, 392 (1967)
- (54) Rose, J.A. und Rieder, S.V. J. Biol. Chem. 231, 315 (1958)
- (55) Levy, H.R., Talalay, P. und Vennesland, B. "Progress in Stereochemistry", (P.de la Mare, Ed.), Butterworths 3, S. 299 (1962)
- (56) Katz, J., Abraham, S. und Chaikoff, I.L. Anal. Chem. 27, 155 (1955)
- (57) Elsdon, S.R. und Gibson, Q.H. Biochem. J. 58, 154 (1954)
- (58) Campbell, R.C. "Statistische Methoden für Biologie und Medizin", Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)
- (59) Müllhofer, G. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, München (1971)
- (60) Müllhofer, G. und Kuntzen, O. "Regulation of Gluconeogenesis", 9. Konf. Ges. Biol. Chem., (H.-D. Söling und B. Willms, Ed.), Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 328 (1971)
- (61) Huth, W., Dierich, Ch., v. Oeynhausen, V. und Seubert, W. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1529 (1972)
- (62) Simon, H. und Palm, D. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5, 920, (1966)
- (63) Palm, D., Rambeck, W. und Schmid, G. 6th FEBS Meeting, Madrid, Abstract 451 (1969)

- (64) Müllhofer, G., Loy, E., Wollenberg, P. und Krämer, R.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 239 (1974)
- (65) Williamson, J.R., Browning, E.T. und Olson, M.S.
Advan. Enzyme Regul. 6, 67 (1968)
- (66) Hoberman, H.D. J. Biol. Chem. 233, 1045 (1958)
- (67) Günther, Th. und Wenzel, M. Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 335, 63 (1963)
- (68) Graves, J.L., Vennesland, B., Utter, M.F. und
Pennington, R.J. J. Biol. Chem. 223, 551 (1956)
- (69) Zehner, J., Loy, E., Müllhofer, G. und Bücher, Th.
Eur. J. Biochem. 34, 248 (1973)
- (70) Blecher, M. und Hunt, N.H. J. Biol. Chem. 247, 7479 (1972)
- (71) Williamson, J.R., Browning, E.T. und Scholz, R.
J. Biol. Chem. 244, 4607 (1969)
- (72) Williamson, J.R., Jakob, A. und Refino, C.
J. Biol. Chem. 246, 7632 (1971)
- (73) Swislocki, N.I. Analytic. Biochem. 38, 260 (1970)
- (74) Freedland, R.A. und Krebs, H.A. Biochem. J. 104, 45P (1967)
- (75) Klingenberg, M. Eur. J. Biochem. 13, 247 (1970)
- (76) Lehninger, A.L. J. Biol. Chem. 190, 345 (1951)
- (77) Bücher, Th. und Klingenberg, M. Angew. Chemie 70, 552
(1958)
- (78) Schimassek, H., Kadenbach, B., Rüssmann, W. und Bücher, Th.
Advan. Enzyme Regul. 1, 103 (1963)
- (79) Bücher, Th. und Rüssmann, W. Angew. Chemie Int. Ed.
Engl. 3, 426 (1964)
- (80) Williamson, J.R., Scholz, R., Thurman, R.G. und Chance, B.
"The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria"
(S. Papa, J.M. Tager, E. Quagliariello und E.C. Slater, Ed.)
Adriatica Editrice, Bari, S. 411 (1969)

- (81) Carnicero, H.H., Moore, C.L. und Hoberman, H.D.
J. Biol. Chem. 247, 418 (1972)
- (82) Borst, P. "Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle", (P.Karlson, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 137 (1963)
- (83) Kadenbach, B. Biochem. Z. 344, 49 (1966)
- (84) Lee, Y.P. und Lardy, H.A. J. Biol. Chem. 240, 1427 (1965)
- (85) Cederbaum, A.I., Lieber, Ch.S., Beattie, D.S. und Rubin, E.
Arch. Biochem. Biophys. 158, 763 (1973)
- (86) Zimmer, P. Thesis, Medizinische Fakultät, München (1974)
- (87) Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O.
und Sies, H. Eur. J. Biochem. 27, 301 (1972)
- (88) Berry, M.N., Kun, E. und Werner, H.V. Eur. J. Biochem. 33,
407, (1973)
- (89) Werner, H.V. und Berry, M.N. Eur. J. Biochem. 42, 315 (1974)
- (90) Schimassek, H. "Wirkungsmechanismen der Hormone",
18. Mosbach-Kolloqu. (P.Karlson, Ed.), Springer-Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York, S. 33 (1967)
- (91) Menahan, L.A. und Wieland, O. Eur. J. Biochem. 10, 188
(1969)
- (92) Böttger, I., Kriegel, H. und Wieland, O. Eur. J. Biochem.
13, 253 (1970)
- (93) Bode, Ch., Bode, Ch., Goebell, H., Godbersen, H. und
Strohmeyer, G. Horm. Metab. Res. 2, 282 (1970)
- (94) Krebs, H.A. "Regulation of Gluconeogenesis", 9. Konf.
Ges. Biol. Chem., (H.-D.Söling und B.Willms, Ed.),
Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 114 (1971)
- (95) Fröhlich, J., Hansen, W. und Scholz, R. "Isolated Liver
Perfusion and its Applications", (I.Bartosek, Ed.)
Raven Press, New York, S. 205 (1973)
- (96) Krebs, H.A., Freedland, R.A., Hems, R. und Stubbs, M.
Biochem. J. 112, 117 (1969)

- (97) Garrison, J.L. und Haynes, R.C., Jr. J. Biol. Chem. 248, 5333 (1973)
- (98) Haslam, J.M. und Krebs, H.A. Biochem. J. 107, 659 (1968)
- (99) Söling, H.-D., Willms, B., Kleineke, J. und Gehlhoff, M. Eur. J. Biochem. 16, 289 (1970)
- (100) Lardy, H.A., Paetkau, V. und Walter, P. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53, 1410 (1965)
- (101) Krebs, H.A., Gascoyne, T. und Notton, B.M. Biochem. J. 102, 275 (1967)
- (102) Anderson, J.H., Nicklas, W.J., Blank, B., Refino, C. und Willimason, J.R. "Regulation of Gluconeogenesis", 9. Konf. Ges. Biol. Chem., (H.-D.Söling und B.Willms, Ed.), Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 293 (1971)
- (103) v.Dam, K. und Meyer, A.J. Ann. Rev. Biochem. 40, 115 (1971)
- (104) Berry, M.N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1449 (1971)
- (105) Longshaw, I.D., Bowen, N.L. und Pogson, Ch.I. Eur. J. Biochem. 25, 366 (1972)
- (106) Berry, M.N. und Kun, E. Eur. J. Biochem. 27, 395 (1972)
- (107) Roobol, A. und Alleyne, G.A.O. Biochem. J. 134, 157 (1973)
- (108) Rognstad, R., Clark, D.G. und Katz, J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1149 (1973)
- (109) Clark, D.G., Rognstad, R. und Katz, J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1141 (1973)
- (110) Clark, D.G., Bloxham, D.P., Holland, P.C. und Lardy, H.A. J. Biol. Chem. 249, 279 (1974)
- (111) Rognstad, R. und Clark, D.G. Eur. J. Biochem. 42, 51 (1974)

- (112) Hoberman, H.D. und D'Adamo, A.F., Jr. J. Biol. Chem. 235, 514 und 519 (1960)
- (113) Rognstad, R. und Katz, J. Biochem. J. 132, 349 (1973)
- (114) Sutherland, E.W. Nobel-Vortrag Angew. Chem. 84, 1117 (1972)
- (115) Rasmussen, H. und Tenenhouse, A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1364 (1968)
- (116) Rasmussen, H. Science 170, 404 (1970)
- (117) Friedmann, N. und Rasmussen, H. Biochim. Biophys. Acta 222, 41 (1970)
- (118) Williams, T.F., Exton, J.H., Friedmann, N. und Park, C.R. Amer. J. Physiol. 221, 1645 (1971)
- (119) Friedmann, N., Somlyo, A.V. und Somlyo, A.P. Science 171, 400 (1971)
- (120) Arinze, I.J. und Hanson, R.W. FEBS Lett. 31, 280 (1973)
- (121) Siess, E.A. und Wieland, O. Eur. J. Biochem. 26, 96 (1972)
- (122) Bygrave, F.L. Nature 214, 667 (1967)
- (123) Fisher, A.B., Scarpa, A., Bassett, D. und Williamson, J.R. 9th Int. Congr. Biochem., Stockholm, Abstract 8h2 (1973)

Verzeichnis der Abkürzungen (synonyme Bezeichnungen in Klammern)

Enzyme

FDPase	- Fructose-1,6-diphosphatase
GAPDH	- Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Triosephosphatdehydrogenase, Glycerinaldehyd- phosphatdehydrogenase)
GDH	- Glycerin-3-phosphatdehydrogenase (Glycero- phosphatdehydrogenase)
G6Pase	- Glucose-6-phosphatase
GPOx	- Glycerin-3-phosphatoxidase (Glycerophosphat- oxidase)
HK	- Hexokinase
LDH	- Lactatdehydrogenase
MDH	- Malatdehydrogenase
PC	- Pyruvatcarboxylase
PDH	- Pyruvatdehydrogenase
PEPCK	- Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PFK	- Fructose-6-phosphatkinase (6-Phosphofructo- kinase)
PGI	- Hexose-6-phosphatisomerase (Phosphohexose- isomerase)
PK	- Pyruvatkinase

Coenzyme und Substrate

AcAc	- Acetoacetat
AMP, ADP, ATP	- Adenosin-5'-mono (di, tri)phosphat
cAMP	- Adenosin-3'; 5'-monophosphat (zyklisches AMP)
CoA	- Coenzym A
DAP	- Dihydroxyaceton-3-phosphat
DBcAMP	- N ⁶ -2'-O-dibutyryl-adenosin-3', 5'-monophosphat
FAD, FADH ₂	- Flavin-aderin-dinucleotid oxidiert, reduziert
FDP	- Fructose-1,6-diphosphat
F6P	- Fructose-6-phosphat
GAP	- Glycerinaldehyd-3-phosphat (Glycerinaldehyd- phosphat)
⧻GP, G-3-P	- Glycerin-3-phosphat (⧻-Glycerophosphat)
G6P	- Glucose-6-phosphat
βHOB	- β-Hydroxybutyrat (β-OH-Butyrat)

⌄ KG	- ⌄ -Ketoglutarat
NAD ⁺ , NADH	- Nicotinamid-adenin-dinucleotid oxidiert, reduziert
NADPH	- Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
OAc	- Oxalacetat
PEP	- Phosphoenolpyruvat
2-PGS	- Glycerat-2-phosphat (2-Phosphoglycerat)
3-PGS, 2,3-diPGS	siehe 2-PGS

Sonstige Abkürzungen

βHOB/AcAc	- β-Hydroxybutyrat : Acetoacetat - Quotient
L/P	- Lactat : Pyruvat - Quotient (Lac/Pyr)
P:O	- energiereiches Phosphat gebildet : Sauer- stoff verbraucht
S.E.M.	- Standardabweichung des Mittelwerts

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher danke ich für die gründliche Einführung in die Theorie und Methodik der Biochemie und für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Physiologisch-Chemischen Institut. Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. G. Müllhofer für seine immerwährende Geduld und große Hilfsbereitschaft bei der Ausführung dieser Arbeit sowie für die unzähligen Diskussionen, in denen er mich mit grundlegenden Problemen des Intermediärstoffwechsels und der Komplexität des Themas vertraut machte.

Frau Ch. von Stetten hat mir mit Sorgfalt und Fleiß bei der Lösung vieler praktischer Probleme geholfen, mein Dank gilt insbesondere auch ihrer Mühe bei der Anfertigung der Fotoarbeiten.

Herr Dr. O. Kuntzen hat durch viele Anregungen das Entstehen der Arbeit gefördert.

Lebenslauf

Ich wurde am 3. Juli 1944 als Sohn des leitenden Bundesbahndirektors i.R. Albert Loy und seiner Gemahlin Hildegard, geb. Köhne, in Detmold/Lippe geboren. Ich habe noch eine Schwester. Unsere Familie übersiedelte 1945 nach München, dort besuchte ich von 1950 bis 1954 die Volksschule und anschließend bis 1963 das Gymnasium. Von 1963 bis 1965 legte ich meinen Wehrdienst ab. Im Wintersemester 1965/66 begann ich an der Universität München das Medizinstudium, nach der ärztlichen Vorprüfung im April 1968 legte ich im Juli 1971 das Staatsexamen ab.

Seit November 1968 arbeitete ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München an der Abteilung von Prof. Bücher, zuerst als studentische Hilfskraft, später dann als Doktorand im Labor von Dr. Müllhofer. Von August 1971 bis Dezember 1972 war ich am selben Institut als Medizinalassistent angestellt.

In der Folgezeit arbeitete ich jeweils 4 Monate als Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung am Kreiskrankenhaus Nürtingen und an der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen. Im Oktober 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit Mai 1974 bin ich als Assistenzarzt am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing, II. Chirurgische Abteilung angestellt.

